

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LÍLIAN VELASCO DIAS MÜLLER

ANÁLISE DOS GENES DO BIOMETABOLISMO *GSTT1*, *GSTM1* E *CYP2D6* EM
PACIENTES COM LEUCEMIAS MIELÓIDE AGUDA E MIELÓIDE CRÔNICA.

CURITIBA

2010

LÍLIAN VELASCO DIAS MÜLLER

Análise dos genes do biometabolismo *GSTT1*, *GSTM1* e *CYP2D6* em pacientes com Leucemias Mielóide Aguda e Mielóide Crônica.

Monografia apresentada à disciplina Estágio em Genética como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Enilze Maria de Souza
Fonseca Ribeiro

Co-Orientador: Prof. Iglénir João Cavalli

CURITIBA
2010

Dedico este trabalho a todos os estagiários que já houveram e que haverão, aprendizes, ferramentas da construção e do conhecimento. Seu pequeno trabalho é como uma gota, que somada a tantas outras formarão um oceano de possibilidades. A estes que, por fim, se realizarão nos tantos Mestres e Doutores do amanhã.

Por não conhecer palavras suficientemente à altura do que quero expressar, eu simplesmente “Agradeço”. Agradeço principalmente à minha mãe, Eliete Velasco Dias, que abriu mão da sua felicidade para me dar a minha, que por todos esses anos esteve tão longe e ao mesmo tempo tão perto em tantos momentos bons e ruins. Agradeço ao meu namorado Matheus Casarotto, que se fez minha família por estes últimos cinco anos. Agradeço aos meus orientadores, Prof. Iglénir João Cavalli e Profa. Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro, que com paciência e carinho me guiaram desde o histórico escolar do terceiro ano do ensino médio... Agradeço também a todos os colegas de laboratório, que sem dúvida estão neste trabalho e por último mas não menos agradeço a Deus, que –criacionismo vs. evolucionismo à parte- me deu a oportunidade de compartilhar também desse segredo maravilhoso que chamamos simplesmente de “vida”.

“O homem que deseja ser cientista e à ciência dedicar seu tempo e amor tem pelo menos três certezas: a de que morrerá um dia (como todo mundo), a de que não ficará rico (como quase todo mundo) e a de que se divertirá muito (como pouca gente).”

Prof. Newton Freire-Maia

RESUMO

As Leucemias são doenças malignas dos glóbulos brancos (leucócitos) de origem, na maioria das vezes não conhecida. O desenvolvimento de câncer depende de uma série de fatores, como intensidade de exposição à carcinógenos e a suscetibilidade genética do indivíduo. A biotransformação de xenobióticos é dividida em duas etapas: fase I - oxidação e biossíntese e fase II - degradação ou detoxificação. Polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvidas no biometabolismo influenciam diretamente a resposta individual a carcinógenos. Este trabalho teve como objetivo realizar um estudo de associação tipo caso-controle, procurando verificar a associação de polimorfismos nos genes do biometabolismo *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2D6* com o desenvolvimento das leucemias mielóide crônica e mielóide aguda. A amostra estudada foi composta por 61 pacientes com LMA e 67 pacientes com LMC e seus respectivos controles, pareados por sexo, etnia e faixa etária (± 5 anos). Foram utilizadas amostras de medula óssea de pacientes e sangue periférico de controles e o DNA foi extraído pelo método de *salting-out*. Os polimorfismos foram analisados através de técnicas de PCR e PCR-RFLP. Para a LMA a média de idade dos pacientes foi de $40,05 \pm 13,10$ e dos controles de $39,59 \pm 12,41$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre estas ($t=0,20$; $P>0,80$). Foi encontrada uma associação positiva entre o gene *GSTT1* e a suscetibilidade à LMA: *GSTT1* - OR = 18,79 (IC 95% = 6,93-50,98), na distribuição da frequência genotípica ($\chi^2_1 = 42,40$; $P<0,001$) e também no estudo dos genótipos de risco em conjuntos para os genes de fase II, *GSTM1* e *GSTT1* (OR = 2,6 – IC 95% = 1,20-5,62). Para os outros genes analisados não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição das frequências genotípicas e também não foram encontradas associações: *GSTM1* – OR = 0,88 (IC 95% = 0,43-1,79) e *CYP2D6* – OR = 0,58 (IC 95% = 0,25-1,35). Para a LMC a média de idades dos pacientes foi de $48,21 \pm 11,94$ e dos controles de $44,60 \pm 9,79$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre estas ($t=0,03$; $P>0,90$). Foi encontrada uma associação positiva entre o gene *GSTT1* e a suscetibilidade à LMC: *GSTT1* - OR = 4,34 – IC 95% = 1,90-9,95, e também na distribuição da frequência genotípica ($\chi^2_1 = 13,06$; $P<0,001$). Para os outros genes analisados não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição das frequências genotípicas e também não foram encontradas associações: *GSTM1* – OR = 0,88 (IC 95% = 0,44-1,76) e *CYP2D6* – OR = 0,54 (IC 95% = 0,26-1,11). Estes resultados sugerem que o gene *GSTT1* possui um envolvimento significativo tanto com a suscetibilidade à leucemia mielóide crônica quanto com a leucemia mielóide aguda. Os outros genes analisados (*GSTM1* e *CYP2D6*), também envolvidos no biometabolismo de diversos carcinógenos, podem não contribuir de forma isolada para o risco de desenvolvimento da LMC e LMA. No entanto, os mesmos podem ser relevantes numa atuação conjunta – entre si e/ou – com outros genes na gênese de diversos cânceres, inclusive as leucemias.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização de GSTs da classe mu e deleção completa do gene <i>GSTM1</i>	15
Figura 2: Deleção completa do gene <i>GSTT1</i>	16
Figura 3: Padrão de bandas dos polimorfismos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> (PCR Multiplex):	20
Figura 4: Padrão de bandas do polimorfismo <i>CYP2D6</i> *4 (PCR-RFLP)	22

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Iniciadores para PCR Multiplex dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> e <i>CYP1A1</i> (controle interno)	19
Quadro 2: Iniciadores para PCR-RFLP do gene <i>CYP2D6</i>	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa da significância estatística para os genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> ...	23
Tabela 2: Estimativa da significância para o gene <i>CYP2D6</i>	23
Tabela 3: Resultados dos estudos de associação para LMA	28
Tabela 4: Resultados dos estudos de associação para LMC	32

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Ausência e presença dos genótipos de risco para os polimorfismos <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>CYP2D6</i> nos portadores de LMA	27
Gráfico 2: LMA: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase II)	27
Gráfico 3: LMA: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase I e II)	28
Gráfico 4: Ausência e presença dos genótipos de risco para os polimorfismos <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>CYP2D6</i> nos portadores de LMC	31
Gráfico 5: LMC: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase II)	31
Gráfico 6: LMC: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase I e II)	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	2
2.1	OBJETIVOS GERAIS	2
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1	LEUCEMIAS	4
3.1.1	Leucemia Mielóide Aguda	8
3.1.2	Leucemia Mielóide Crônica	5
3.2	METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS	11
3.3	POLIMORFISMOS EM GENES DO BIOMETABOLISMO E CÂNCER	12
3.3.1	Fase I - Genes da Família Citocromo P450 (CYPs)	12
3.3.2	Fase II - Genes da Família Glutathione S-transferases (GSTs)	14
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	17
4.2	PROCEDIMENTOS.....	17
4.2.1	Coletas de Medula Óssea e Armazenamento das amostras.....	17
4.2.2	Extração do DNA genômico	18
4.3	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DOS PRODUTOS	18
4.3.1	Reação de co-amplificação dos genes <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	18
4.3.2	Reação de amplificação e restrição do gene <i>CYP2D6*4</i> – <i>Bst</i> NI	20
4.4	ANÁLISE DOS DADOS	22
5	RESULTADOS	25
5.1	LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA.....	25
5.1.1	Frequências genotípicas.....	25
5.1.2	Estudo de associação.....	26
5.2	LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA.....	29
5.2.1	Frequências genotípicas.....	29
5.2.2	Estudo de associação.....	30
6	DISCUSSÃO	333
7	CONCLUSÕES	366
	REFERÊNCIAS.....	377

APÊNDICES	411
APÊNDICE A: DADOS BRUTOS OBTIDOS PARA LMA E LMC	42

1 INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células. Claramente uma doença genética, o câncer é o resultado de um acúmulo de mutações em pontos específicos do DNA que promovem um desequilíbrio no controle do ciclo celular. As causas do câncer podem ser externas ou internas, estão inter-relacionadas e referem-se, respectivamente, a questões como o meio ambiente, hábitos ou costumes de uma sociedade e à capacidade do organismo de se defender, este último aspecto resultante de características genéticas pré-determinadas.

A biotransformação é o processo onde as substâncias são metabolizadas e eliminadas. O biometabolismo é feito em duas fases: a primeira ou Fase I, onde ocorre a ativação das substâncias pela criação de centros eletrofílicos e a segunda ou Fase II, onde ocorre a eliminação pela conjugação com substratos endógenos. Polimorfismos nos genes que atuam na biotransformação podem levar a alterações na função ou expressão de proteínas, levando a um desequilíbrio na ativação/inativação de substâncias e influenciando a suscetibilidade ao câncer.

Estudos que analisam polimorfismos genéticos têm sido importantes ferramentas para o conhecimento do câncer e identificação de subgrupos populacionais que apresentem maiores riscos, repercutindo em efetividade no desenvolvimento e direcionamento de terapias.

Leucemias são malignidades hematopoiéticas onde a intensa proliferação irregular de células jovens (blásticas) faz com que estas substituam as células normais na medula óssea. De acordo com o tipo de linhagem envolvida (mielóide ou linfóide) e com o grau de diferenciação das células as leucemias são classificadas em quatro grades categorias: Leucemia Mielóide Aguda, Leucemia Mielóide Crônica, Leucemia Linfóide Aguda e Leucemia Linfóide Crônica.

Neste trabalho serão analisados os genes do biometabolismo *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2D6* entre controles e portadores de Leucemia Mielóide Aguda e Leucemia Mielóide Crônica através de PCR e PCR-RFLP.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Identificar marcadores moleculares que auxiliem na prevenção, prognóstico e terapêutica de portadores de leucemia mielóide aguda e crônica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar as frequências alélicas e genotípicas dos genes anteriormente referidos em pacientes e controles;
- Realizar estudo de associação tipo caso-controle para verificar presença ou ausência de associação entre as variantes alélicas e a ocorrência de LMA e LMC;
- Comparar os resultados obtidos com outros trabalhos descritos na literatura.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

David Von Hanseemann e Theodor Boveri foram os principais contribuidores ao início dos debates sobre a relação entre alterações cromossômicas, tumorigênese e malignidades (HARDY; ZACHARIAS, 2005). Seus estudos datados de 1890 e 1914, respectivamente, foram os primeiros com observações relevantes sobre a origem e desenvolvimento do câncer.

O patologista alemão Hanseemann observou divisões nucleares assimétricas em biópsias de cânceres epiteliais humanos e em vários outros tumores, embora tenha permanecido cético, por toda a sua vida, com relação ao fato de tais anormalidades serem as causas dos tumores.

Quase 25 após as observações iniciais de Hansenmann, Boveri postulou que aberrações cromossômicas seriam responsáveis pelo comportamento maligno das células cancerosas, mas esta hipótese só pôde ser confirmada na década de 60, com a evolução dos estudos citogenéticos de células neoplásicas (MITELMAN, 1994). O desenvolvimento das pesquisas em câncer se intercalou com o progresso da genética e da biologia molecular, sendo que a melhoria de técnicas de manipulação gênica permitiu a clonagem e identificação de genes localizados nos pontos de quebra das alterações cromossômicas, possibilitando um grande avanço nos estudos sobre a etiologia da doença (FRANK, 2007).

O câncer é hoje claramente compreendido como uma doença genética, que ocorre pelo acúmulo de mutações ao longo dos anos em genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular (SUGIMURA, 1998). Embora a maioria dos cânceres origine-se de uma única célula anormal, uma sucessão de eventos ? são necessários para que se estabeleça o processo cancerígeno. Na transformação celular pelo menos duas classes de genes representam alvos críticos para agentes carcinogênicos: proto-oncogenes e genes supressores tumorais. Mutações que ativam oncogenes ou inativam genes supressores tumorais são de grande importância na iniciação de neoplasias (ALBERTS et al., 2002; BABA; CÂTOI, 2007).

Os oncogenes representam formas alteradas dos proto-oncogenes celulares normais cujos produtos são elementos de controle positivo do ciclo celular, como receptores de fatores de crescimento, proteínas de transdução de sinais e

reguladores transcricionais. Outros produtos de proto-oncogenes atuam na regulação negativa de vias apoptóticas (GRIFFITHS et. al., 1999). A ativação dos oncogenes celulares pode-se dar por alterações reguladoras, estruturais ou por mutações de ponto. Como consequência dessas alterações, a expressão dos oncogenes comanda a proliferação anormal das células e a formação do tumor (COOPER, 1994).

A função dos genes supressores tumorais é complementar à dos proto-oncogenes: alguns codificam reguladores negativos do ciclo celular enquanto outros codificam reguladores positivos da apoptose. Mutações em genes supressores de tumor são de grande importância na carcinogênese, pois alterações nestes liberam a célula da inibição regulada nos pontos de checagem, levando à proliferação desordenada (GRIFFITHS et al., 1999; WEINBERG, 1991).

3.1 LEUCEMIAS

Desordens mieloproliferativas são caracterizadas pela proliferação de linhagens celulares medulares, com ou sem inibição da maturação, que resultam na hiperplasia de células blásticas, granulócitos, eritrócitos ou trombócitos.

O termo leucemia inclui as neoplasias de todas as linhagens celulares hematopoiéticas onde ocorre uma invasão massiva do sangue, medula óssea, baço, fígado e linfonodos, com gradual substituição das células hemolinfopoiéticas normais (BABA; CÂTOI, 2007).

A “*Estimativa 2010 de Incidência do Câncer no Brasil*” estima para os anos 2010 e 2011 a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer, sendo esperados 236.240 para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino.

Para a leucemia são esperados aproximadamente 9.580 casos para o Brasil e com relação ao Paraná a taxa bruta de incidência estimada para o ano de 2010 é de 6,56 casos para cada 100.000 homens e de 5,39 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2010).

As leucemias são divididas em quatro tipos principais classificadas de acordo com o tipo de linhagem envolvida (mielóide ou linfóide) e com o grau de diferenciação das células (agudas ou crônicas) em: Leucemias Mielóides Agudas (LMA) e Crônicas (LMC) e Leucemias Linfóides Agudas (LLA) e Crônicas (LLC).

A leucemia aguda progride rapidamente e afeta a maioria das células imaturas (ainda não totalmente diferenciadas), que perdem a capacidade de desempenhar as suas funções normais. As células imaturas são denominadas “linfoblastos” e “mieloblastos” que multiplicam-se de forma anormal e acumulam-se impedindo que sejam produzidas células sanguíneas normais.

A leucemia crônica progride lentamente permitindo o crescimento de maior número de células já maduras. Em geral, essas células mais diferenciadas podem ser capazes de exercer algumas de suas funções normais.

3.1.1 Leucemia Mielóide Aguda

As leucemias agudas são doenças heterogêneas, tanto sob o aspecto morfológico como biológico, pois o processo neoplásico que dá origem ao clone leucêmico pode se originar em diversas fases do desenvolvimento das diferentes linhagens celulares da medula óssea. As tentativas de separar estas doenças de acordo com suas semelhanças resultaram na identificação de dois grandes grupos de LA com evolução clínica e resposta terapêutica distintas, as leucemias mielóides agudas (LMA) e as leucemias linfóides agudas (LLA).

A leucemia mielóide aguda é uma doença geneticamente pleiomórfica, caracterizada por uma interrupção da maturação associada à proliferação descontrolada de células progenitoras hematopoiéticas. Aproximadamente 60% dos pacientes apresentam cariótipo anormal, sem que se possa no entanto identificar quais anormalidades representaria os eventos primários na patogênese da LMA (LÖWENBERG, 2008; GREGORY, 2009).

Embora entre crianças a Leucemia Linfocítica Aguda seja a mais predominante, entre os adultos a LMA é de longe a variedade mais comum. Representando 25% de todos os tipos de leucemia e 85% dos casos de leucemia aguda, ainda continua a apresentar as menores taxas de sobrevivência dentre todas as leucemias. Sua ocorrência é maior no ocidente, apresentando uma incidência de 3,4 para 100.000 pessoas ou de 2,5 para cada 100.000 pessoas quando ajustado pela idade para a população padrão mundial (KUFE et al., 2003; DESCHLER; LÜBBERT, 2006).

Nas últimas três décadas se intensificaram os estudos das alterações citogenéticas e moleculares na patogenia da LMA, tornando-se cada vez mais aparente a heterogeneidade no nível molecular (GRIMWADE; HILLS, 2009). É de grande importância a definição de anormalidades genéticas individuais ou combinações de marcadores que possam fornecer informações significativas para o estabelecimento de relações pré-tratamento afim de um melhor resultado para o paciente.

A classificação FAB (Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico) inicialmente baseia-se na semelhança morfológica da célula normal com o seu equivalente leucêmico, reconhecendo subtipos que refletem o grau de maturação e a linhagem celular comprometida. Além da presença de grânulos, os blastos mielóides apresentam precocemente na sua diferenciação a enzima mieloperoxidase (MPO), que ocorre apenas em células de linhagem mielomonocítica, tendo sido arbitrado pelo grupo FAB que a sua presença em pelo menos 3% das células blásticas caracterizaria uma leucemia aguda como LMA (LUSIS, 2000). As publicações do grupo FAB definiram oito subtipos de LMA: LMA M0 ou Mieloblástica sem diferenciação, LMA M1 ou sem maturação LMA M2 ou Mieloblástica com diferenciação granulocítica, LMA M3 ou Promielocítica hipergranular, LMA M3v ou Promielocítica variante, LMA M4 ou Mielomonocítica, LMA M5 ou Monocítica ou Monoblástica e LMA M7 ou Megacarioblástica.

3.1.1.1 Aspectos Citogenéticos e Moleculares da LMA

As primeiras descrições de alterações cariotípicas em LMA foram publicadas no final dos anos 50, muito antes de ser possível a identificação individual de cromossomos humanos. Quando os primeiros estudos de bandejamento foram realizados, no início dos anos 70, descobriu-se que aproximadamente metade dos pacientes possuíam aberrações clonais. Esta porcentagem permaneceu constante por um longo período até que posteriormente, com estudos de diversos laboratórios, os cariótipos anormais foram observados em 70-80% ou mais dos pacientes estudados (HEIM e MITELMAN, 1995).

Embora o perfil cariotípico na maioria das vezes seja diferente entre os diversos casos, a distribuição das alterações não é aleatória. Algumas das aberrações se encontram principalmente associadas a subtipos hematológicos,

refletindo uma concordância entre características morfológicas e citogenéticas que indicam a importância das aberrações na patogênese.

Algumas das reconhecidas anormalidades estruturais características da LMA são produtos de:

- Translocações: t(1;3)(p36;q21), t(1;7)(q10;p10), t(1;22)(p13;q13), t(1;11)(q21;q23), t(3;3)(q21;q26), t(3;5)(q21-25;q31-35), t(3;21)(q26;q22), t(6;9)(p23;q34), t(6;11)(q27;q23), t(7;11)(p15;p15), t(8;16)(p11;p13), t(8;21)(q22;q22), t(9;11)(p21-22;q23), t(9;22)(q34;q11), t(10;11)(p11-15;q13-23), t(11;17)(q23;q25), t(11;19)(q23;p13), t(15;17)(q22;q11-21), t(16;16)(p13;q22) e t(16;21)(p11;q22).
- Inversões: inv(3)(q21q26) e inv(16)(p13q22).
- Inserções: ins(3;3)(q26;q21q26).
- Deleções: del(5q), del(7q), del(9q), del(12p), del(16)(22q), del(20q)
- Isocromossomos: i(17q)
- Aberrações numéricas: Trissomias (dos cromossomos 4, 8, 9, 11, 13, 21 e 22), monossomias (do cromossomo 7) e perda do cromossomo Y.

O desenvolvimento da leucemia mielóide aguda tem sido associado com diversos fatores de risco, como idade do paciente, doenças hematológicas prévias, vírus, desordens genéticas (como por exemplo Síndrome de Down, Klinefelter, Patau, Ataxia-Teleangiectasia, Síndrome de Shwachman, Anemia de Fanconi, Neurofibromatose), exposição a agentes físicos e químicos (benzeno, pesticidas, herbicidas, fumo), radiações (terapêuticas e não-terapêuticas) e quimioterapia (agentes alquilantes, inibidores de topoisomerasas, antraciclinas) embora estes sejam responsáveis por apenas uma pequena parte dos casos observados (DESCHLER e LÜBBERT, 2006).

A ocorrência de Leucemia mielóide aguda encontra-se relacionada aos processos quimioterápicos. Após o tratamento de muitas desordens malignas um dos efeitos do intenso regime genotóxico é o surgimento de uma nova malignidade anos após o término do tratamento. Esta segunda malignidade é, na maior parte dos casos, uma leucemia mielóide aguda que passa então a ser chamada de LMA secundária (sLMA) ou LMA relacionada à terapia (tLMA) (HEIM e MITELMAN, 1995).

3.1.2 Leucemia Mielóide Crônica

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma desordem mieloproliferativa caracterizada pela expansão clonal de células hematopoiéticas maduras ou bem-diferenciadas. Com uma incidência de dois casos para cada 100.000 pessoas, e pico de incidência entre 45 e 55 anos de idade, representa de 7-20% de todos os casos de leucemia é a melhor caracterizada no nível molecular (AGUILERA; TSIMBERIDOU, 2009; VON BUBNOFF; DUYSER, 2010; BAYRAKTAR; GOODMAN, 2010).

Foi descrita há mais de 150 anos, independentemente, por Donné em Paris (1844), Virchow na Alemanha (1845) e Craigie e Bennet em Edimburgo (1845) (CHOPRA; PU; ELEFANTY, 1999; DEININGER, 2008). Mais de cem anos depois, em 1960, Nowell e Hungerford descreveram um cromossomo anormal que podia ser encontrado na linhagem celular mielóide maligna de 85% dos pacientes com LMC (NOWELL; HUNGERFORD, 1960)

A leucemia mielóide crônica é uma das poucas malignidades ativadas por um único oncogene. Os portadores desta leucemia apresentam um rearranjo genômico característico que se deve a uma translocação cromossômica recíproca entre a região q34 do cromossomo 9 e a região q11 do cromossomo 22 sendo descrita como t(9;22)(q34;q11). No cromossomo 22, a quebra ocorre dentro do gene *BCR* e no cromossomo 9 ocorre dentro do gene *ABL*; resultando em dois cromossomos derivativos.

Um deles é o cromossomo *Philadelphia* (Ph) que apresenta o centrômero do 22 e a região proximal do gene *BCR* justaposta à região distal do gene *ABL*, formando o gene quimérico *BCR-ABL*. O outro produto é formado no cromossomo 9q+, que contém a parte proximal do gene *ABL* justaposta à parte mais distal do gene *BCR*, formando outro gene quimérico (*ABL-BCR*), cujo produto gênico é expresso em níveis muito baixos na metade ou em dois terços dos indivíduos com LMC.

O cromossomo *Philadelphia* foi a primeira evidência consistente da associação entre uma anormalidade cromossômica e um tipo específico de leucemia (NOWELL, 2002). O gene quimérico *BCR-ABL* é funcional e está presente na maioria dos pacientes com LMC. Ele é dito “quimérico” porque resulta da quebra e fusão de dois genes que se encontravam em cromossomos diferentes. É regulado pela região promotora do gene *BCR*, já que seus dois componentes se encontram

alinhados com uma seqüência de leitura contínua, permitindo a formação de um transcrito (RNA mensageiro) que codifica para uma proteína de fusão com propriedades de tirosina-quinase, responsável pela transformação maligna. (FERREIRA e ROCHA et al., 2006).

Embora esta mutação cromossômica já tenha sido considerada patognomônica da LMC, evidências da fusão do gene BCR-ABL ou translocação $t(9;22)(q34;q11)$ são encontradas em aproximadamente um terço dos casos de LLA e em menos de um por cento dos casos de LMA, e existe ainda um grupo substancial assintomático de pessoas saudáveis que possuem esta aberração cromossômica (BAYRAKTAR, S., GOODMAN, M., 2010).

A leucemia mielóide crônica possui três fases distintas de atividade:

- Fase Crônica (CP) – Fase inicial na qual geralmente acontece o diagnóstico e que se não tratada avança para a fase acelerada. Os pacientes apresentam uma heterogeneidade clínica ainda não bem compreendida molecularmente, que envolve questões como fatores ambientais e diferenças genéticas entre os indivíduos. Quase 50% dos pacientes são assintomáticos. Clinicamente apresenta leucocitose ($>100.000/\mu\text{l}$) com contínua transformação para mieloblastos ou promielócitos e esplenomegalia.
- Fase Acelerada (AP) – Geralmente apresenta-se entre três a cinco anos após o diagnóstico e é caracterizada por aspectos clínicos como o elevado número de células blásticas no sangue ou medula óssea, contagem variável de plaquetas (número elevado ou abaixo do normal), aumento do número de basófilos no sangue periférico e por fim presença de outras anomalias cromossômicas como o duplo *Ph*, trissomia dos cromossomos 8 e 9 e novas translocações ou deleções. A duração até a progressão para a crise blástica é geralmente de 4 a 6 meses.
- Crise Blástica (BC) – Infiltrado extramedular no sangue ou medula óssea (compatível com o quadro clínico de leucemia aguda) e elevado número de células blásticas ($\geq 20\%$). Apenas 20% a 30% dos pacientes com LMC em crise blástica respondem a indução com quimioterápicos e apresentam sobrevida de 3 a 6 meses.

3.1.2.1 Aspectos Citogenéticos e Moleculares da LMC

A anormalidade citogenética característica da LMC é o cromossomo *Philadelphia* (*Ph*), derivado do cromossomo 22 e resultante da translocação recíproca entre os cromossomos 9 e 22. Em 2-10% dos casos esse cromossomo origina-se de rearranjos variantes decorrentes tanto de simples aberração envolvendo a região 22q11 como de alterações complexas envolvendo ambas as regiões 9q34 e 22q11 com um terceiro ou mais cromossomos.

Esta translocação causa a fusão do gene Abelson *tk* (*ABL*) com uma região de 5,8kb do gene *BCR* (*Breakage cluster region*) que codifica uma proteína constitutiva com atividade excessiva de tirosina quinase capaz de ativar múltiplos sinais de vias transducionais levando à promoção do crescimento, proliferação (via ativação de *RAS*), aumento da atividade transcricional (via recrutamento de *STAT*) e sobrevivência/diminuição da apoptose (através da ativação de *PI(3)K/AKT*) das células hematopoiéticas, além de mudanças na adesão (RADICH, 2007; AGUILERA e TSIMBERIDOU, 2009; WANG et al., 2010; REKSODIPUTRO et al., 2010). Além da proteína de fusão o gene quimérico *BCR-ABL* tem sido indicado como uma causa direta de instabilidade genética por aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem levar a transversões e transições nos pares de bases GC-TA e GC-AT, respectivamente. Ainda, linhagens celulares com tirosina-quinases ativadas como as que apresentam o *BCR-ABL* acumulam mais danos ao DNA que células normais com quinases ativas, porém estas células normais de fato reparam os danos ao DNA mais rapidamente (RADICH, 2007).

O gene *ABL* é um proto-oncogene humano e localiza-se em 9q34, ocupa uma região de aproximadamente 225kb e possui 11 éxons (FERREIRA e ROCHA et al., 2006). O gene *BCR*, com atividade de quinase, localiza-se em 22q11, apresenta aproximadamente 135kb e possui 23 éxons. Este gene codifica uma proteína de 160kDa, a p160 ou proteína *BCR*, amplamente expressa em tecidos normais. Esta proteína é uma molécula transdutora de sinal multifuncional que contém três domínios estruturais principais; um deles é a região amino-terminal, codificada pelo primeiro éxon do *BCR* e possui atividade serina/treonina-quinase (MARU et al., 1991). Essa região é essencial para a ligação da proteína *ABL* e sua ativação.

Em diferentes patologias as regiões de quebra-fusão são diferentes: em aproximadamente 98% das LMC a região de quebra se encontra em uma sub-região de 5,8kb do gene *BCR* chamada M-*BCR* ("Major"-*BCR*), entre os éxons 12

(denominado b1) e 16 (denominado b5), enquanto em grande parte das Leucemias Linfóides Agudas (LLA), por exemplo, a quebra ocorre na sub-região do gene *BCR* chamada m-*BCR* ("minor"-*BCR*). No gene *ABL* a maioria das quebras ocorre entre os éxons 1b e 2, de modo que o éxon 2 do *ABL* é justaposto a jusante (sentido 3') do segmento translocado do gene *BCR* (FERREIRA e ROCHA et. al., 2006).

3.2 METABOLISMO DE XENOBIÓTICOS

Diariamente os organismos são expostos a uma grande variedade de xenobióticos. Grande parte destes compostos são pequenos, lipofílicos e se acumulam facilmente nas células, gerando uma toxicidade que pode atingir níveis letais. O processo de biotransformação ocorre devido à função de enzimas que reconhecem e convertem os xenobióticos a formas solúveis em água que podem então ser eliminadas do organismo.

O metabolismo de xenobióticos é composto por duas fases: Inicialmente as substâncias são metabolizadas pelas enzimas de fase I, onde ocorre a criação de centros eletrofílicos nas moléculas através de reações de oxidação. A criação desses centros reativos permite que enzimas de fase II conjuguem o metabólito eletrofílico com várias moléculas endógenas, como a glutatona, sulfato, glicose e acetato, resultando num metabólito final hidrofílico passível de eliminação.

Durante o processo de biotransformação a toxicidade do xenobiótico pode ser reduzida/eliminada no processo de metabolização, o que de fato ocorre em muitas situações, ou pode haver um aumento da toxicidade especialmente após as reações de fase I dependendo da estrutura do xenobiótico. Quando o metabólito é genotóxico e potencialmente carcinogênico, pode ocorrer a formação de ligações covalentes com a molécula de DNA, formando os chamados adutos de DNA (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Muitas famílias diferentes de enzimas estão envolvidas no metabolismo de xenobióticos, mas as mais estudadas são: Citocromo P450 (CYPs), Glutathione S-transferases (GSTs) e N-acetil-transferases (NATs). As enzimas da Família CYP atuam na fase I, também chamada fase de ativação, e as enzimas pertencentes às Famílias GSTs e NATs atuam na fase II, também chamada de fase de detoxificação (AUTRUP, 2000).

As enzimas pertencentes a estas famílias são codificadas pelos genes do biometabolismo e muitos destes genes são polimórficos. Alguns dos mecanismos moleculares responsáveis pela formação de polimorfismo em genes de suscetibilidade incluem deleção completa do gene, mutações na região promotora – alterando a taxa de expressão – ou nas junções íntrons/éxons, mutações em aminoácidos essenciais ou não críticos e amplificação gênica. A diversidade populacional ou individual em genes de suscetibilidade é um dos fatores responsáveis ou pela eficácia terapêutica de medicamentos ou pela presença de efeitos colaterais. Entre os diversos fenótipos existentes para a enzima, um deles apresenta pouca capacidade de metabolização e o outro extensiva capacidade metabólica (SILVA, ERDTMANN, HENRIQUES, 2003).

Polimorfismos em genes do biometabolismo podem ocasionar um aumento da ativação de agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos ou diminuição da capacidade de inativação destes compostos, sendo provável que indivíduos portadores de alguns polimorfismos tenham risco aumentado de desenvolvimento de cânceres quando expostos a carcinógenos (WÜNSCH; GATTÁS, 2001).

A variabilidade dos genes de suscetibilidade explica a maioria das diferenças individuais e populacionais observadas para o metabolismo de xenobióticos carcinogênicos, para a presença de efeitos colaterais de medicamentos ou da dependência química, entre outras situações.

3.3 POLIMORFISMOS EM GENES DO BIOMETABOLISMO E CÂNCER

3.3.1 Fase I - Genes da Família Citocromo P450 (CYPs)

Esta superfamília compreende pelo menos cinco subfamílias, designadas de A a E pelo sistema de nomenclatura recomendada (NEBERT et al., 1987), sendo que mais de 50 genes já foram descritos no genoma humano. As enzimas do citocromo P450 formam uma ubíqua família de proteínas-heme envolvidas na biossíntese de esteróides, lipídios, vitaminas, produtos naturais e também no metabolismo de xenobióticos (CHEFSON; AUCLAIR, 2006). Durante a biotransformação, os produtos destes genes atuam nas reações da fase I, fazendo a ativação de substâncias tóxicas. Entre os mais estudados estão os da família *CYP1* e *CYP2*.

O gene *CYP2D6* está mapeado no cromossomo 22 (22q13.1) (GOUGH et al., 1993) e codifica uma enzima com atividade no metabolismo de pelo menos 80 drogas, como antidepressivos, antiarrítmicos, neurolépticos, entre outros (AUTRUP, 2000). É o mais polimórfico entre os genes da superfamília do Citocromo P450, com mais de 110 variantes alélicas descritas (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2d6.htm>). Estas variantes são resultantes de mutações de ponto, adições, rearranjos gênicos e deleções ou duplicações do gene inteiro resultando em um aumento, redução ou perda completa da atividade da enzima (INGELMAN-SUNDBERG; EVANS, 2001; MA; WOO; McLEOD, 2002; KITADA, 2002).

Desde a identificação dos polimorfismos no gene *CYP2D6* muitos estudos mostraram que os fenótipos variam significativamente entre diferentes grupos étnicos (MA, WOO e McLEOD, 2002, EVANS E RELLING, 2004), e que este polimorfismo pode ter um papel importante na indução dos efeitos adversos da administração de alguns agentes terapêuticos, como aqueles aplicados na oncologia (INGELMAN-SUNDBERG et al., 1999). Muitos medicamentos usados comumente na oncologia são metabolizados via *CYP2D6*, e os polimorfismos deste gene podem potencialmente induzir importantes efeitos clínicos, que vão depender da droga envolvida e do genótipo do paciente (BERNARD et al., 2006).

A maioria dos indivíduos (80-90%) possui pelo menos um alelo selvagem (*CYP2D6*1*) e são classificados funcionalmente como bons metabolizadores ou rápidos (*Ems*). Outras categorias são: metabolizadores pobres (*PMs*), que herdaram os dois alelos *CYP2D6* deficientes (estes indivíduos metabolizam as drogas em taxas notavelmente baixas), metabolizadores intermediários (*IMs*), e ainda metabolizadores ultra-rápidos (*UMs*) devido à uma amplificação do alelo selvagem, sendo que há uma grande variabilidade dos possíveis genótipos, e portanto, dos possíveis fenótipos em relação à atividade da enzima. (SACHSE et al., 1997). Indivíduos com fenótipo de bons metabolizadores foram relacionados com câncer de bexiga (ANWAR et al., 1996), provavelmente pela alta taxa de metabolização de agentes da dieta que formam intermediários reativos em vários tecidos (HATAGIMA, 2002). Por outro lado, os indivíduos com baixa metabolização parecem apresentar um risco elevado de desenvolvimento de leucemias (RODDAM et al., 2003).

Um dos alelos mutantes é o *CYP2D6*4*, que apresenta uma transição G-A na posição 1934 da molécula de DNA, gerando um produto não funcional (CARACO, 2004). Pessoas com esta mutação apresentam o fenótipo *PM*, com um risco elevado

de efeitos colaterais ou dificuldades terapêuticas durante o tratamento com drogas metabolizadas pelo *CYP2D6* (STUVEN et al. 1996).

3.3.2 Fase II - Genes da Família Glutathione S-transferases (GSTs)

As enzimas glutathione S-transferases (GSTs) possuem a função básica de detoxificação, mediando a conjugação de um grande número de compostos eletrofílicos com glutathione reduzida (GSH), numa reação metabólica de fase II (PICKETT et al., 1989), facilitando a excreção dos xenobióticos. Sete classes distintas foram identificadas: *alpha* (α); *mu* (μ); *pi* (ρ); *sigma* (σ); *theta* (θ); *kappa* (κ) e *zeta* (ζ) (LANDI, 2000). Cada classe é codificada por um único gene ou por uma família gênica. As GSTs vêm sendo associadas com uma maior suscetibilidade genética em um grande número de cânceres, incluindo os hematológicos como Leucemia Linfóide Aguda (LLA), Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Leucemia Linfocítica Crônica (LLC) e a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) (BAJPAI et al., 2007).

Uma classe importante no estudo de leucemias é a classe *mu*, na qual cinco genes (*GSTM1* a 5) foram mapeados no cromossomo 1 (1p13.3) (PERSSON et al., 1993). Os genes estão separados por aproximadamente 20 kb. Para o gene *GSTM1*, a ausência de um dos alelos, conhecida como “alelo nulo” (*GSTM1*0*) parece resultar de uma permuta desigual entre duas regiões altamente repetitivas que flanqueiam o gene, gerando uma deleção de 16 kb que inclui todo o gene (Figura 1). O fenótipo nulo tem uma frequência acima de 50% entre caucasóides, chineses e indianos (BOARD, 1990), sendo que esta deficiência pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de tumores, devido ao aumento da sensibilidade do indivíduo a carcinógenos químicos específicos (VAN POPPEL et al., 1992). O gene *GSTM1* é particularmente relevante na detoxificação de carcinógenos intermediários como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, como o benzopireno (BAJPAI et al., 2007).

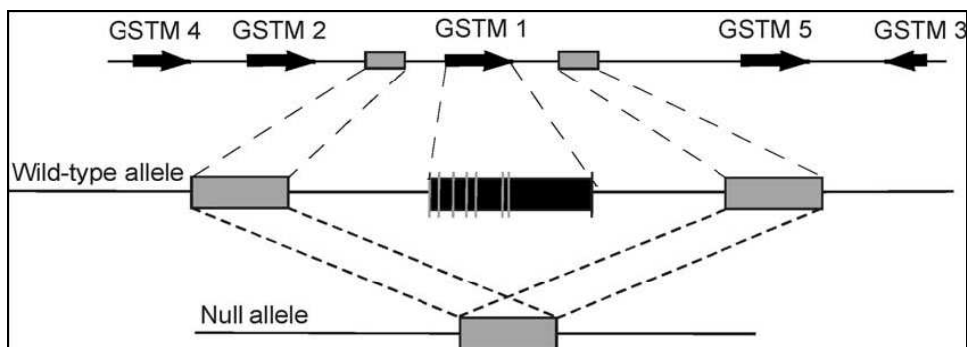


Figura 1: Localização de GSTs da classe mu e deleção completa do gene GSTM1

FONTE: PARL, 2005.

Outro gene de importância nos estudos sobre suscetibilidade ao câncer, é o da classe *theta* *GSTT1*, mapeado no cromossomo 22 (22q11.2) (PEMBLE et al., 1994). Este gene está envolvido no metabolismo do óxido de etileno (EO), um agente genotóxico capaz de produzir translocações hereditárias e alterar a frequência de anormalidades cromossômicas espontâneas (LOURENÇO, 2005); é altamente conservado durante a evolução e tem um papel importante na fase II da reação metabólica, atuando na biotransformação de um grande número de drogas e produtos químicos industriais, entre eles agentes citotóxicos e hidrocarbonetos de baixa reatividade (ex: hidrocarbonetos halogenados) (BAJPAI et al., 2007). Em humanos, a conjugação do halometano dependente de glutathione é polimórfica, com 60% da população classificada como “conjugadores” e 40% como “não conjugadores”.

A presença ou ausência do gene é coincidente com o fenótipo conjugador (*GSTT1+*) e não conjugador (*GSTT1-*). A ausência da enzima implica na não detoxificação de uma série de compostos, como os halometanos sintéticos e outros químicos industriais. De maneira semelhante à deleção do gene *GSTM1*, a deleção do *GSTT1* aparentemente é causada por uma recombinação homóloga envolvendo duas seqüências altamente repetitivas que flanqueiam o gene, resultando em uma deleção de 54 kb que contém o gene inteiro (Figura 2) (PARL, 2005).

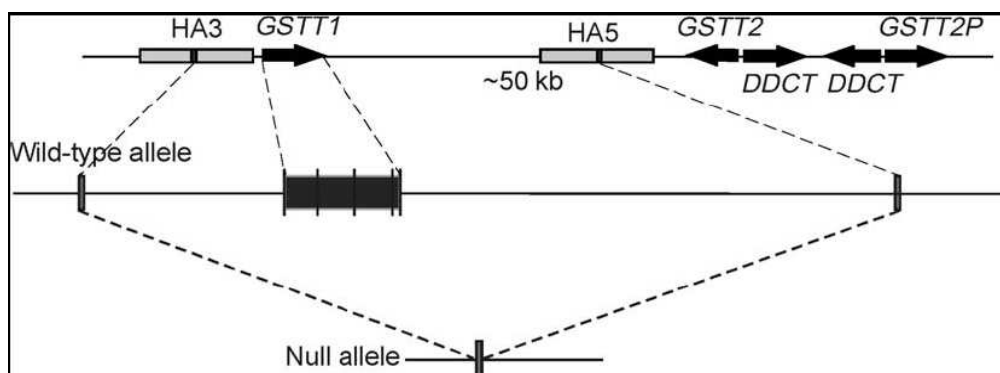


Figura 2: Deleção completa do gene GSTT1

FONTE: PARL, 2005.

É de grande importância o estudo conjunto destes polimorfismos, para que se possa determinar “perfis” genotípicos e fenotípicos de predisposição ao câncer na população.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Este trabalho foi realizado com amostras de medula óssea de 61 pacientes portadores de leucemia mielóide aguda (LMA) e 67 pacientes portadores de leucemia mielóide crônica (LMC), provenientes do Laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas, UFPR, Curitiba, bem como de igual número de indivíduos controles (pertencentes ao banco de DNA do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, UFPR), pareados por sexo, etnia e faixa etária (± 5 anos).

4.2 PROCEDIMENTOS

4.2.1 Coletas de Medula Óssea e Armazenamento das amostras

As coletas de medula óssea foram realizadas nas dependências do ambulatório de Hematologia do Hospital de Clínicas (HC), UFPR, Curitiba/PR, do Hospital Nossa senhora das Graças (HNSG) e do Hospital Erasto Gaertner (HEG), ambos de Curitiba, PR. pelo médico responsável, através de punção na crista ilíaca posterior, com agulhas e seringas descartáveis estéreis. De cada indivíduo foram coletados cerca de 5 ml de medula óssea (em seringas estéreis contendo heparina), imediatamente encaminhado ao Laboratório de Citogenética do HC, onde parte do material foi colocado em cultura para análise citogenética. O restante do material, cerca de 3 ml, foi encaminhado para o Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética do Departamento de Genética da UFPR, onde foi realizada a separação dos leucócitos por centrifugação em Histopaque[®] (1ml da amostra era ressuspensa em 1ml de solução salina 0,9% e posteriormente centrifugada em 1ml de Histopaque[®] a 1800rpm durante 20 minutos; dessa centrifugação resulta um anel de leucócitos que deve ser retirado) e posteriormente feita a lise das células sanguíneas carregadas com os leucócitos em sua obtenção (através de sucessivas lavagens e centrifugações com RCLB 1X a 13000rpm).

4.2.2 Extração do DNA genômico

Para a extração do DNA genômico foi utilizado o método de *salting out*, segundo BIGNON e FERNANDEZ-VIÑA (1997), com modificações, que possibilita a obtenção de DNA de alto peso molecular. Este método consiste no rompimento mecânico e/ou enzimático dos tecidos, eliminação das proteínas e ácidos graxos pela ação de solventes orgânicos e precipitação do DNA por etanol. Após a extração do DNA a amostra foi ressuspensa em 100 µl de água ultrapura e armazenada a 0°C. Posteriormente foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.), e obtidas as concentrações de DNA de todas as amostras, através do espectrofotômetro *Nanodrop* com o objetivo de padronizar as concentrações das amostras em 10ng/µl.

4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) E ANÁLISE DOS PRODUTOS

Para análise dos genes *GSTM1* e *GSTT1* foi utilizada a técnica de PCR-Multiplex, e para o gene *CYP2D6* foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), cujas respectivas condições de amplificação e análise dos produtos já se encontravam padronizadas. Foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) já conhecidos para cada um dos locos estudados, e todos os reagentes utilizados em cada uma das reações de PCR eram misturados em um único microtubo de 1,5ml a fim de garantir a homogeneidade das reações.

Os produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 2,0% para a PCR-Multiplex e 1,8% e 2,0% para a PCR-RFLP, analisados em transiluminador de luz ultravioleta e documentados em sistema de captação de imagens pelo *software* "Digi doc-it".

4.3.1 Reação de co-amplificação dos genes *GSTM1* e *GSTT1*

A reação de co-amplificação em cadeia foi baseada no protocolo de ABDEL-RAHMAN et al. (1996), nas seguintes condições:

- 5,25 µl de água ultra pura estéril;
- 2,5 µl de tampão da enzima (20 mM de tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl);
- 1,0 µl de MgCl₂ (2 mM);

- 1,0 µl de cada iniciador (100 ng/µl): *GSTM1*₁, *GSTM1*₂, *GSTT1*₁, *GSTT1*₂, *CYP1A1*₁, *CYP1A1*₂;
- 5,0 µl de dNTPs (2 mM) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- 0,25 µl de Taq DNA polimerase (5 U).

Em cada microtubo de 0,5 ml, foram pipetados 5 µl do DNA genômico (10 ng/µl) previamente extraído e 20 µl da mistura de reação, somando um volume total de 25 µl. Os oligonucleotídeos utilizados reação de PCR Multiplex estão apresentados no quadro abaixo:

INICIADORES
<p><i>GSTM1:</i></p> <p>5'GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC3' e 5'GTTGGGCTAAATATACGGTGG3'</p> <p><i>CYP1A1:</i></p> <p>5'GAACTGCCACTTCAGCTGTCT3' e 5'CAGCTGCATTTGGAAGTGCTC3'</p> <p><i>GSTT1:</i></p> <p>5'TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC3'e 5'TCACCGGATCATGGCCAGCA3'</p>

Quadro 1: Iniciadores para PCR Multiplex dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP1A1* (controle interno)

FONTE: BAJPAI et al., 2007

A mistura foi submetida ao programa apresentado abaixo em um termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf):

- 1 ciclo: 94°C por 5 minutos;
- 30 ciclos: 94°C por 2 minutos, 59°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto;
- 1 ciclo: 72°C por 4 minutos;

Após o término da reação de PCR, o produto da PCR foi mantido em geladeira (4°C) até sua utilização.

O padrão de bandas visualizado após a PCR Multiplex (figura 4) é mostrado na FIGURA 3 abaixo. Os iniciadores para o gene *CYP1A1* amplificam um fragmento constante de 312 pb, o qual é usado como controle interno da reação, excluindo a possibilidade de uma falsa interpretação dos resultados devido à ausência da reação de amplificação. O fragmento de 215 pb é visualizado somente nos casos de

indivíduos que possuam o genótipo *GSTM1* positivo, e o fragmento de 480 pb apenas nos casos de indivíduos que possuam o genótipo *GSTT1* positivo. A ausência de amplificação *GSTM1* (215 pb) ou *GSTT1* (480 pb), na presença de controle interno, indica os respectivos genótipos nulos para cada gene.

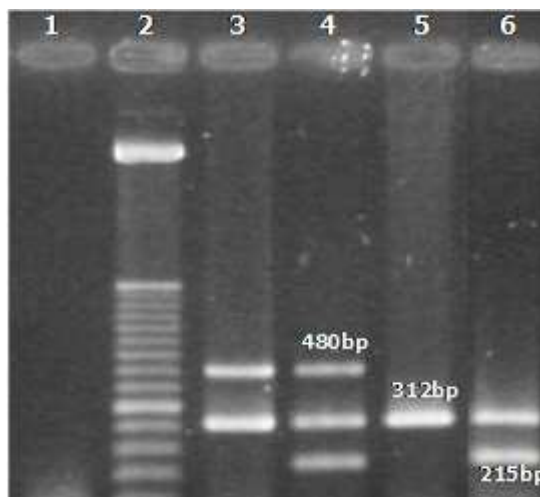


Figura 3: Padrão de bandas dos polimorfismos *GSTM1* e *GSTT1* (PCR Multiplex):

Legenda:

- | | |
|-------------------------------------|------------------------------------|
| 1-Controle Negativo; | 2-Marcador de Peso Molecular 50pb; |
| 3- <i>GSTM1</i> - / <i>GSTT1</i> +; | 4- <i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> +; |
| 5- <i>GSTM1</i> - / <i>GSTT1</i> -; | 6- <i>GSTM1</i> +/ <i>GSTT1</i> -. |

4.3.2 Reação de amplificação e restrição do gene *CYP2D6**4 – *Bst*N1

O polimorfismo *CYP2D6**4 deve-se à presença ou ausência do sítio de restrição *Bst*N1 pela mudança de base G→A na posição 1934 da molécula de DNA, gerando um produto não funcional (CARACO, 2004). Para amplificação deste gene (PCR) foi utilizado o protocolo modificado com o par de iniciadores D-1 e D-2, nas seguintes condições:

- 32,2 µl de água ultra-pura estéril;
- 5,0 µl de tampão da enzima (20 mM de tris-HCl pH 8,4; 50 mM de KCl);
- 1,5 µl de MgCl₂ (2 mM);
- 2,0 µl de cada iniciador (100 ng/µl): *GSTM1*₁, *GSTM1*₂, *GSTT1*₁, *GSTT1*₂, *CYP1A1*₁, *CYP1A1*₂;
- 2,0 µl de dNTPs (2 mM) (dATP, dCTP, dTTP, dGTP);
- 0,3 µl de Taq DNA polimerase (5 U).

Em cada microtubo de 0,5 ml, foram pipetados 5 µl do DNA genômico (10 ng/µl) previamente extraído e 45 µl da mistura de reação, somando um volume total de 50 µl. Os oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR-RFLP estão apresentados no quadro abaixo:

Iniciadores
<p><i>CYP2D6</i> (<i>Bst</i>N1):</p> <p>D1 (5'-GCCTTCGCCAACCACTCCG-3')</p> <p>D2 (5'-AAATCCTGCTCTTCCGAGGC-3')</p>

Quadro 2: Iniciadores utilizados na reação de PCR-RFLP do gene *CYP2D6*

FONTE: CARACO, 2004.

A mistura foi submetida ao programa apresentado abaixo em um termociclador (Mastercycler Gradient - Eppendorf):

- 1 ciclo: 94° C por 5 minutos;
- 30 ciclos: 94° C por 1 minutos, 56° C por 1 minuto, 72° C por 1 minutos;
- 1 ciclo: 72°C por 6 minutos;

Após o término da reação, foi feita uma corrida em gel de agarose 1,8% utilizando cerca de 15µl do produto de PCR para observar a ocorrência e a qualidade da amplificação. Posteriormente foi realizada a clivagem com a enzima de restrição *Bst*N1, segundo o protocolo abaixo:

- 10µl de Produto de PCR;
- 0,2µl de enzima de restrição *Bst*N1;
- 2,0µl de tampão da enzima (1x);
- 0,2µl de BSA;
- 7,6µl de água ultra-pura estéril.

A reação de restrição foi incubada por 3 horas a 60°C. Sua análise foi feita em gel de agarose 2,0% e o padrão de bandas obtido é mostrado na FIGURA 4 abaixo. O genótipo homozigoto selvagem (A1/A1) é representado por duas bandas de 230 e 104pb, pois possui um sítio para a enzima de restrição *Bst*N1, que cliva o produto de amplificação. O genótipo homozigoto mutante (A2/A2) não possui sítio de restrição para esta enzima de restrição, sendo representado por uma única banda,

não clivada, de 334pb. O genótipo heterozigoto (A1/A2) apresenta as três bandas de 334, 230 e 104pb (CARACO, 2004).

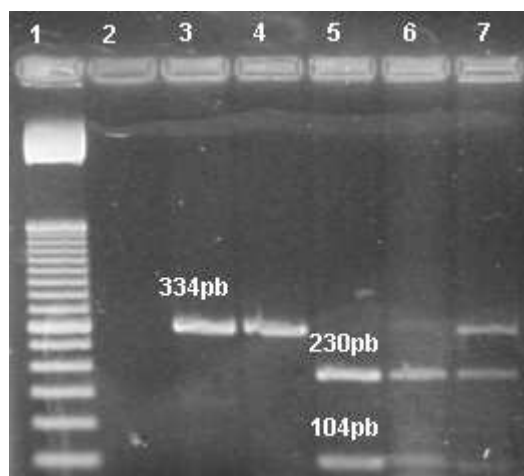


Figura 4: Padrão de bandas do gene *CYP2D6*4* após reação de PCR-RFLP

Legenda:

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| 1 – Marcador de Peso Molecular 50pb; | 2 – Controle Negativo; |
| 3 e 4 – Genótipo Homozigoto Mutante; | 5 e 6 – Genótipo Homozigoto Selvagem; |
| 7 – Genótipo Heterozigoto. | |

4.4 ANÁLISE DOS DADOS

O teste t de Student foi utilizado para comparar as médias de idade entre pacientes e controles, e o teste do Qui-quadrado de homogeneidade para verificar se os genótipos observados se distribuíam igualmente em pacientes e controles.

Para analisar a associação entre as variantes polimórficas e ocorrência de LMA e LMC, foram comparadas as freqüências dos genótipos de risco dos genes *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2D6* de pacientes e controles, através do teste de risco relativo ODDS RATIO com intervalo de confiança de 95%.

Para os genes *GSTM1* e *GSTT1*, nos quais os heterozigotos não foram identificados, a significância estatística das diferenças das freqüências genotípicas entre pacientes e controles foi estimada a partir de uma tabela de contingência 2X2, como mostrado na TABELA 1:

Genótipos	Pacientes	Controles
Positivo para o fator pesquisado (ausência do gene)	A	B
Negativo para o fator pesquisado (presença do gene)	C	D

Tabela 1: Estimativa da significância estatística para os genes *GSTM1* e *GSTT1*

FONTE: O autor, 2010

A OR (razão de chances ou *Odds Ratio*) foi calculada da seguinte maneira:

$$OR = (A \times D) / (C \times B)$$

Sendo A, B, C e D as frequências absolutas obtidas.

Para o gene *CYP2D6*, no qual os três genótipos foram identificados, a significância estatística das diferenças das frequências genotípicas foi estimada a partir de uma tabela de contingência 3X2 demonstrada na TABELA 2:

Genótipos	Pacientes	Controles
G/G	A	D
G/A	B	E
A/A	C	F

Tabela 2: Estimativa da significância para o gene *CYP2D6*

FONTE: O autor, 2010

A OR foi calculada de acordo com o esquema descrito abaixo, onde A, B, C, D, E e F são as frequências absolutas obtidas.

$$OR \text{ G/G} = 1,0 \text{ (adotado como referência)}$$

$$OR \text{ G/A} = (B \times D) / (A \times E)$$

$$OR \text{ A/A} = (C \times D) / (A \times F)$$

As frequências genóticas observadas para gene *CYP2D6* foram ainda comparadas com as frequências esperadas de acordo com o Teorema de Hardy-Weinberg, conforme BEIGUELMAN, 1988.

A análise conjunta dos genótipos considerados de risco foi realizada através de tabelas de contingência 2x2 considerando combinações genóticas da fase I e II e apenas de fase II e também através de tabela de contingência 4x2 considerando combinações genóticas de fase I e II.

5 RESULTADOS

5.1 LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA

A média de idade dos pacientes foi de $40,05 \pm 13,10$ e dos controles de $39,59 \pm 12,41$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($t=0,20$; $P>0,80$). Com relação ao sexo, 28 (46%) dos pares de pacientes e controles são do sexo feminino e 33 (54%) do sexo masculino. Em relação à etnia, 54 (89%) dos pacientes e controles são euro-descendentes e 7 (11%) são afro-descendentes.

5.1.1 Freqüências genótípicas

Para o gene *GSTM1*, 34 pacientes apresentaram o genótipo positivo (freqüência de $+/+$ e $+/-$ = 0,56) e 27 o genótipo *GSTM1* nulo (freqüência $-/-$ = 0,44). Nos controles foram observados 32 indivíduos *GSTM1* positivos (freqüência de $+/+$ e $+/-$ = 0,53) e 29 *GSTM1* nulos (freqüência $-/-$ = 0,47), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genótípicas nos pacientes e controles ($\chi^2_1 = 0,132$; $P>0,70$).

Para o gene *GSTT1*, 20 pacientes apresentaram o genótipo positivo (freqüência de $+/+$ e $+/-$ = 0,33) e 41 o genótipo *GSTT1* nulo (freqüência $-/-$ = 0,67). Nos controles foram observados 55 indivíduos *GSTT1* positivos (freqüência $+/+$ e $+/-$ = 0,90) e 6 indivíduos *GSTT1* nulos (freqüência $-/-$ = 0,10). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genótípicas entre pacientes e controles ($\chi^2_1 = 42,40$; $P<0,001$).

Assumindo como pressuposto que o caráter sob estudo esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg é possível estimar a freqüência aproximada de indivíduos heterozigotos para os genes *GSTM1* e *GSTT1*. Para o gene *GSTM1* a freqüência estimada de heterozigotos foi de 0,45 nos pacientes e 0,43 nos controles; já para o gene *GSTT1* a freqüência estimada de heterozigotos foi de 0,29 nos pacientes e 0,43 nos controles.

Para o gene *CYP2D6* foram observados 34 (74%) pacientes com genótipo homozigoto selvagem ($A1/A1$), 10 (22%) com o genótipo heterozigoto ($A1/A2$) e 2

(4%) com o genótipo homozigoto mutante (A2/A2). As freqüências alélicas encontradas nos pacientes foram de 0,85 para o alelo selvagem e 0,15 para o alelo mutante. Entre os controles foram observados 38 (62%) indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem, 23 (38%) com o genótipo heterozigoto e nenhum indivíduo com o genótipo homozigoto mutante, com freqüências alélicas igual a 0,81 e 0,19 respectivamente para o alelo selvagem e para o mutante. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genotípicas nos pacientes e controles ($\chi^2_2 = 5,35$; $P > 0,05$). As freqüências genotípicas mostraram-se de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes ($\chi^2_1 = 1,36$; $P > 0,20$) quanto nos controles ($\chi^2_1 = 2,94$; $P > 0,05$).

5.1.2 Estudo de associação

Para o gene *GSTT1* 41 pacientes e 6 controles apresentaram o genótipo considerado de risco (*GSTT1*-) e para o gene *GSTM1* 27 pacientes e 29 controles apresentaram o genótipo nulo, considerado de risco (*GSTM1*-).

Para o gene *CYP2D6*, 12 pacientes e 23 controles apresentaram genótipos considerados de risco (A1/A2 – heterozigoto e/ou A2/A2 – homozigoto mutante).

Para o estudo de associação, pacientes e controles foram comparados quanto à presença ou ausência do genótipo considerado de risco dos três genes (*GSTM1*-, *GSTT1*- e *CYP2D6* A1/A2 + A2/A2). Foi encontrada associação positiva entre a presença do genótipo de risco e a leucemia mielóide aguda para o gene *GSTT1* (OR = 18,79 – IC 95% = 6,93-50,98). Os genes *GSTM1* – OR = 0,88 (IC 95% = 0,43-1,79) e *CYP2D6* – OR = 0,58 (IC 95% = 0,25-1,35) não apresentaram associação entre os genótipos de risco e LMA (GRÁFICO 1).

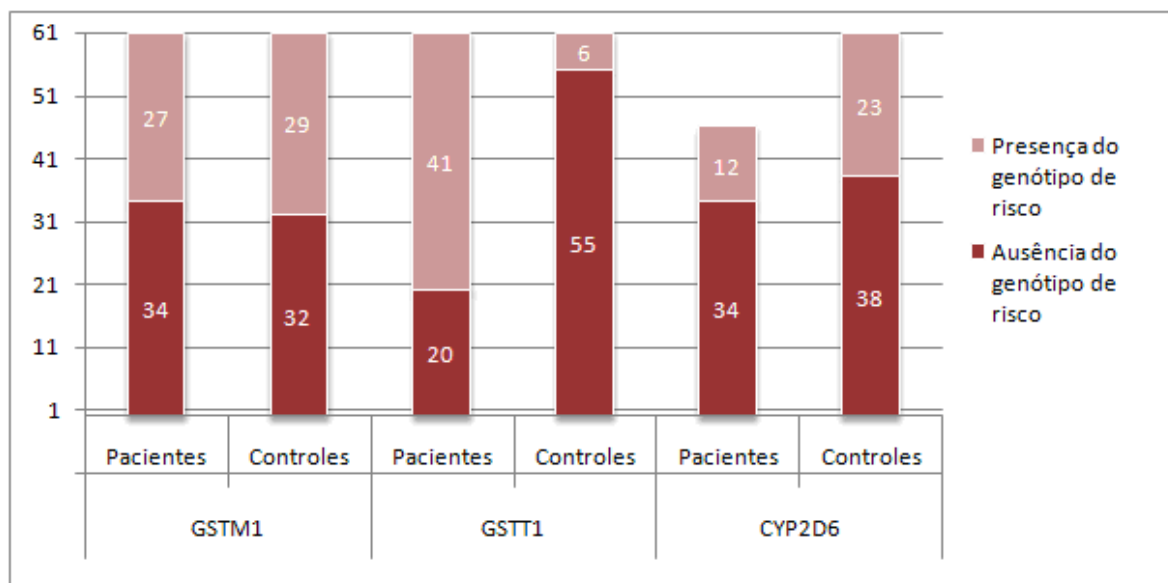


Gráfico 1: Ausência e presença dos genótipos de risco para os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2D6* nos portadores de LMA

FONTE: O autor, 2010.

Ao considerar as razões de probabilidade considerando em conjunto os genótipos considerados de risco dos genes envolvidos na fase II, *GSTM1* e *GSTT1*, foi encontrada associação com a leucemia mielóide aguda (OR = 2,6 – IC 95% = 1,20-5,62) (GRÁFICO 2).

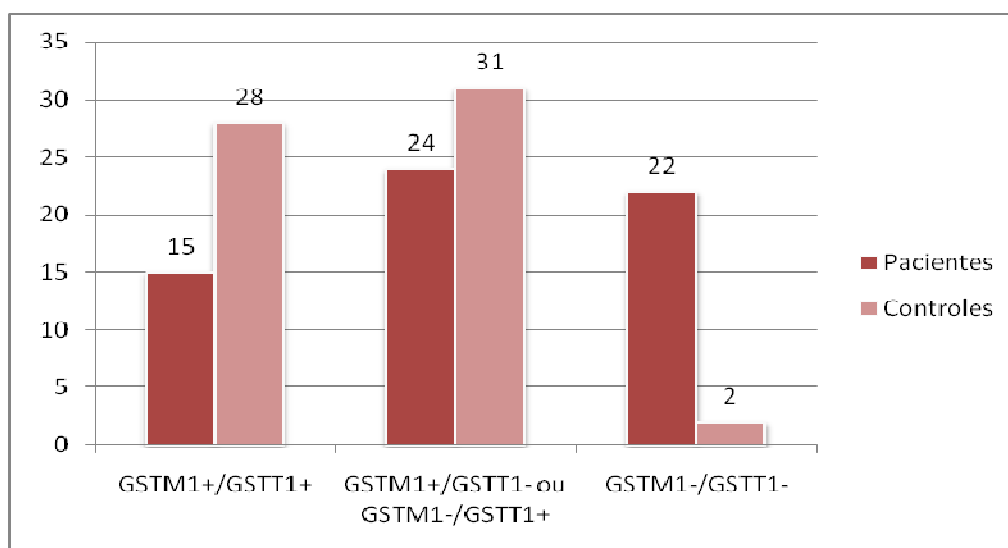


Gráfico 2: LMA: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase II)

FONTE: O autor, 2010

A distribuição dos indivíduos com 0, 1, 2 e 3 genótipos de risco nos pacientes e nos controles foi avaliada pelo teste do qui-quadrado não se observando diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_3=6,24;P>0,10$).

A avaliação da *odds ratio* dos genótipos de risco considerados em conjunto não demonstrou associações positivas com LMA: indivíduos com somente um genótipo de risco OR = 1,17 (IC 95% = 0,44-3,14) e indivíduos com dois ou três genótipo considerados de risco OR = 2,38 (IC 95% = 0,87-6,52) (GRÁFICO 3).

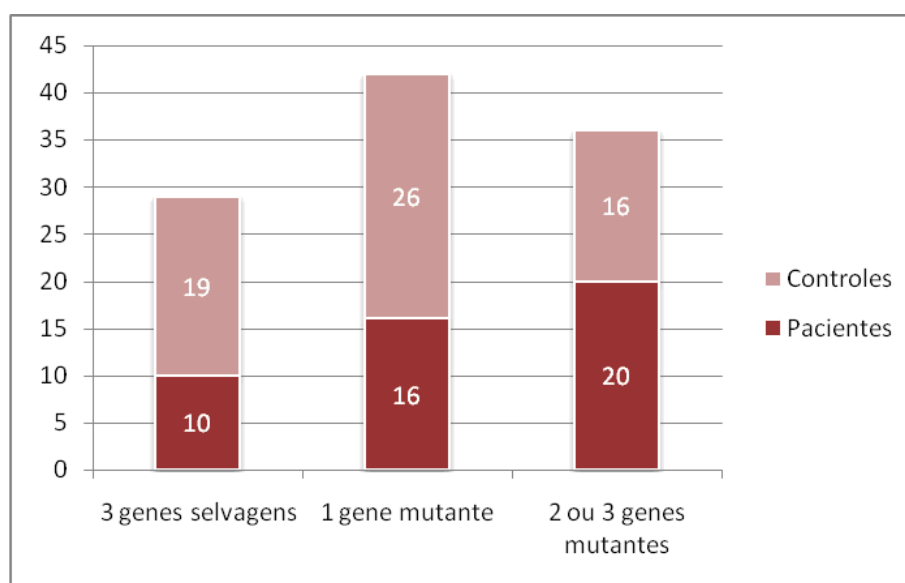


Gráfico 3: LMA: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase I e II)

FONTE: O autor, 2010.

A tabela 3 sumariza os resultados encontrados para LMA:

Estudo de Associação	
<i>GSTM1</i> – Pacientes x Controles	OR = 0,88 – IC 95% = 0,43-1,79
<i>GSTT1</i> – Pacientes x Controles	<u>OR = 18,79 – IC 95% = 6,93-50,98</u>
<i>CYP2D6</i> – Pacientes x Controles	OR = 0,58 – IC 95% = 0,25-1,35
Genótipos em Conjunto – <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	<u>OR = 2,60 – IC 95% = 1,20-5,62</u>
Genótipos em Conjunto – <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>CYP2D6</i>	
Indivíduos com 1 genótipo de risco	OR = 1,17 – IC 95% = 0,44-3,14
Indivíduos com 2 e 3 genótipos de risco	OR = 2,38 – IC 95% = 0,87-6,52

Tabela 3: Resultados dos estudos de associação para LMA

FONTE: O autor, 2010.

5.2 LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA

A média de idade dos pacientes foi de $48,21 \pm 11,94$ e dos controles de $44,60 \pm 9,79$, sendo que não houve diferença estatisticamente significativa entre as mesmas ($t=0,03$; $P>0,90$). Com relação ao sexo, 35 (52%) dos pares de pacientes e controles são do sexo feminino e 32 (48%) do sexo masculino. Em relação à etnia, 59 (88%) dos pacientes e controles são euro-descendentes e 8 (12%) são afro-descendentes.

5.2.1 Freqüências genotípicas

Para o gene *GSTM1*, 40 pacientes apresentaram o genótipo positivo (freqüência de $+/+$ e $+/-$ = 0,60) e 27 o genótipo *GSTM1* nulo (freqüência $-/-$ = 0,40). Nos controles foram observados 38 indivíduos *GSTM1* positivos (freqüência de $+/+$ e $+/-$ = 0,57) e 29 *GSTM1* nulos (freqüência $-/-$ = 0,43), sendo que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genotípicas nos pacientes e controles ($\chi^2_1 = 0,124$; $P>0,70$).

Para o gene *GSTT1*, 38 pacientes apresentaram o genótipo positivo (freqüência de $+/+$ e $+/-$ = 0,57) e 29 o genótipo *GSTT1* nulo (freqüência $-/-$ = 0,43). Nos controles foram observados 57 indivíduos *GSTT1* positivos (freqüência $+/+$ e $+/-$ = 0,85) e 10 indivíduos *GSTT1* nulos (freqüência $-/-$ = 0,15). Foi observada uma diferença estatisticamente significativa na distribuição das freqüências genotípicas entre pacientes e controles ($\chi^2_1 = 13,06$; $P<0,001$).

Assumindo como pressuposto que o caráter sob estudo esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg é possível estimar a freqüência aproximada de indivíduos heterozigotos para os genes *GSTM1* e *GSTT1*. Para o gene *GSTM1* a freqüência estimada de heterozigotos foi de 0,47 nos pacientes e 0,45 nos controles; já para o gene *GSTT1* a freqüência estimada de heterozigotos foi de 0,45 nos pacientes e 0,48 nos controles.

Para o gene *CYP2D6* foram observados 45 (70%) pacientes com genótipo homozigoto selvagem ($A1/A1$), 18 (28%) com o genótipo heterozigoto ($A1/A2$) e 2 (2%) com o genótipo homozigoto mutante ($A2/A2$). As freqüências alélicas encontradas nos pacientes foram de 0,84 para o alelo selvagem e 0,16 para o alelo

mutante. Entre os controles foram observados 37 (56%) indivíduos com o genótipo homozigoto selvagem, 27 (41%) com o genótipo heterozigoto e 2 (3%) indivíduos com o genótipo homozigoto mutante, sendo a frequência alélica igual a 0,77 para o alelo selvagem e 0,23 para o mutante, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição das frequências genotípicas nos pacientes e controles ($\chi^2_2 = 2,88$; $P > 0,20$). As frequências genotípicas mostraram-se de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg tanto nos pacientes ($\chi^2_1 = 0,56$; $P > 0,30$) quanto nos controles ($\chi^2_1 = 1,80$; $P > 0,10$).

5.2.2 Estudo de associação

Para o gene *GSTT1* 29 pacientes e 10 controles apresentaram o genótipo considerado de risco (*GSTT1*-) e para o gene *GSTM1* 27 pacientes e 29 controles apresentaram o genótipo considerado de risco (*GSTM1*-).

Para o gene *CYP2D6*, 19 pacientes e 29 controles apresentaram genótipos considerados de risco (A1/A2 – heterozigoto e/ou A2/A2 – homozigoto mutante).

Para o estudo de associação, pacientes e controles foram comparados quanto à presença ou ausência do genótipo considerado de risco dos três genes (*GSTM1*-, *GSTT1*- e *CYP2D6* A1/A2 + A2/A2). Foi encontrada associação positiva entre a presença do genótipo de risco e a leucemia mielóide crônica para o gene *GSTT1* (OR = 4,34 – IC 95% = 1,90-9,95). Os genes *GSTM1* – OR = 0,88 (IC 95% = 0,44-1,76) e *CYP2D6* – OR = 0,54 (IC 95% = 0,26-1,11) não apresentaram associação entre os genótipos de risco e LMC (GRÁFICO 4).

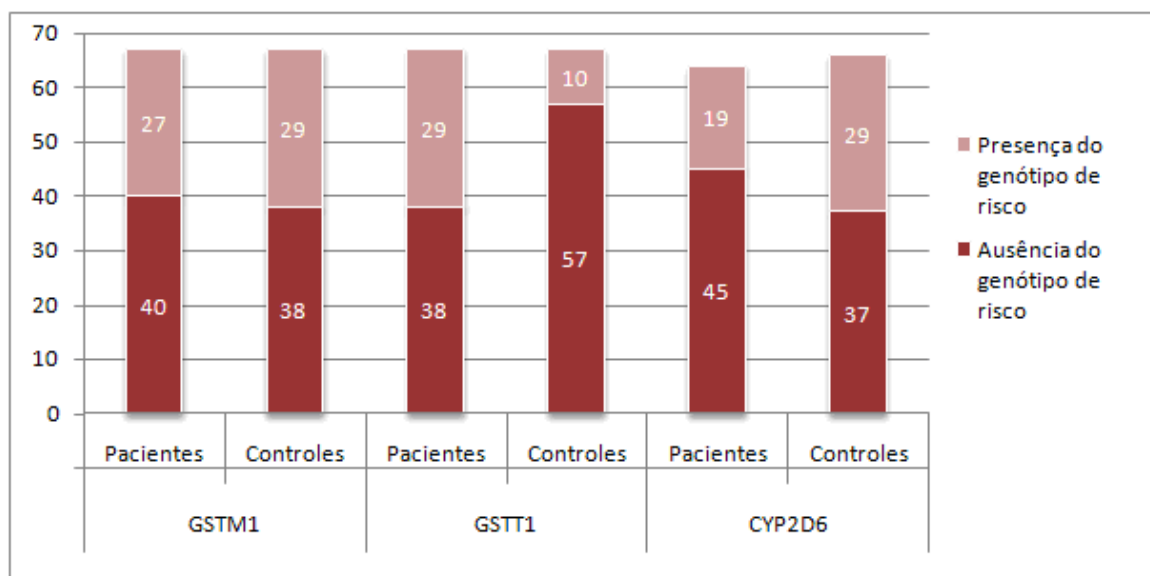


Gráfico 4: Ausência e presença dos genótipos de risco para os polimorfismos *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2D6* nos portadores de LMC

FONTE: O autor, 2010

Ao calcular as razões de probabilidade considerando em conjunto os genótipos considerados de risco dos genes envolvidos na fase II, *GSTM1* e *GSTT1*, não foi encontrada associação com a leucemia mielóide crônica (OR = 1,64 – IC 95% = 0,82-3,27) (GRÁFICO 5).

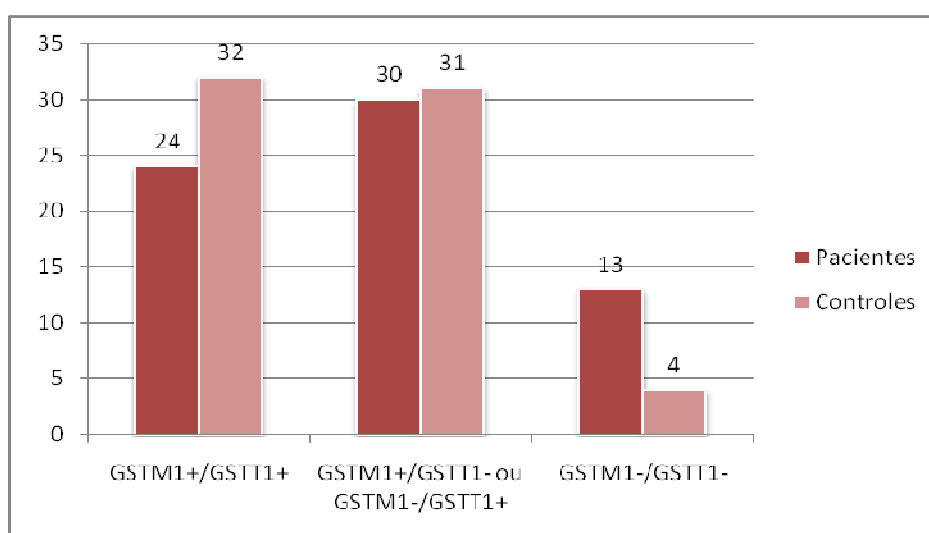


Gráfico 5: LMC: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase II)

FONTE: O autor, 2010

A distribuição dos indivíduos com 0,1,2 e 3 genótipos de risco nos pacientes e nos controles foi avaliada pelo teste do qui-quadrado, não se observando diferenças estatisticamente significativas ($\chi^2_3=2,04$; $P>0,50$).

A avaliação da *odds ratio* dos genótipos de risco considerados em conjunto não demonstrou associações positivas com LMC: indivíduos com somente um genótipo de risco OR = 0,94 (IC 95% = 0,41-2,18) e indivíduos com dois ou três genótipo considerados de risco OR = 1,17 (IC 95% = 0,48-2,85) (GRÁFICO 6).

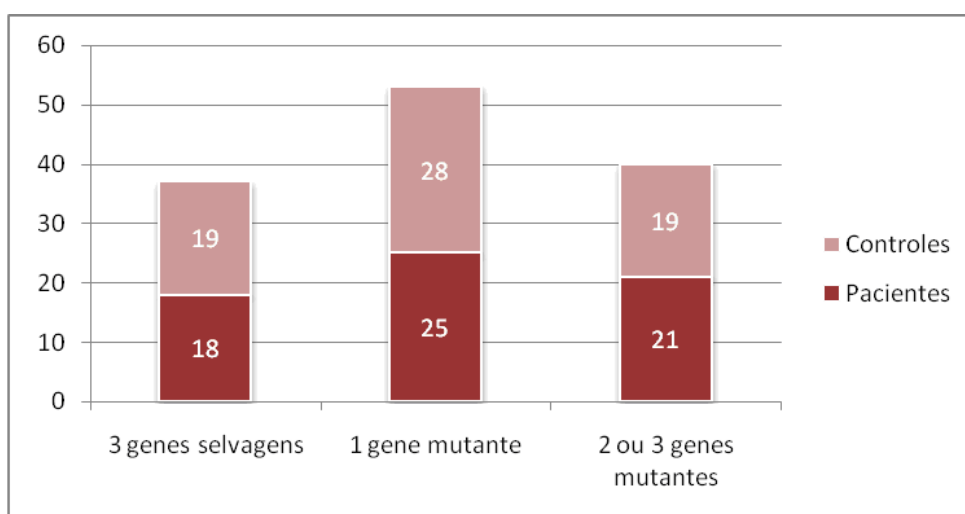


Gráfico 6: LMC: Ausência e presença dos genótipos de risco em conjunto (Fase I e II)

FONTE: O autor, 2010

A tabela 4 sumariza os resultados encontrados para a LMC:

Estudo de Associação	
<i>GSTM1</i> – Pacientes x Controles	OR = 0,88 – IC 95% = 0,44-1,76
<i>GSTT1</i> – Pacientes x Controles	<u>OR = 4,35 – IC 95% = 1,90-9,95</u>
<i>CYP2D6</i> – Pacientes x Controles	OR = 0,54 – IC 95% = 0,26-1,11
Genótipos em Conjunto – <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i>	OR = 1,64 – IC 95% = 0,82-3,27
Genótipos em Conjunto – <i>GSTM1</i> , <i>GSTT1</i> e <i>CYP2D6</i>	
Indivíduos com 1 genótipo de risco	OR = 0,94 – IC 95% = 0,41-2,18
Indivíduos com 2 e 3 genótipos de risco	OR = 1,17 – IC 95% = 0,48-2,85

Tabela 4: Resultados dos estudos de associação para LMC

FONTE: O autor, 2010.

6 DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, um grande esforço tem sido feito na identificação dos fatores envolvidos na suscetibilidade genética ao câncer e como consequência, uma grande quantidade de dados qualitativos e quantitativos sobre as variantes alélicas no genoma humano tem sido apresentada. Associações entre polimorfismos em genes envolvidos na biotransformação de xenobióticos e a suscetibilidade a vários tipos de câncer têm sido descritas por vários autores (DONG, 2008). Um sistema importante de enzimas envolvidas no biometabolismo pertence à superfamília do citocromo P450 (CYP). Estas enzimas atuam na Fase I, ou fase oxidativa da biotransformação, e polimorfismos nesses genes têm sido amplamente investigados sobre a sua relação com a suscetibilidade ao desenvolvimento de câncer. Os genes da família das glutationas-S-transferases (GSTs) pertencem ao grupo envolvido na Fase II do biometabolismo de xenobióticos. A frequência de alelos polimórficos, especialmente *GSTM1* e *GSTT1* têm sido descrita em vários tipos de câncer (TAPSINAR et al., 2008).

A identificação de alterações genéticas envolvidas na progressão do câncer tem fornecido uma variedade de marcadores moleculares e testes que podem redefinir os critérios para o diagnóstico desta doença e prover novos parâmetros para a detecção precoce, de fundamental importância por possibilitar um melhor procedimento terapêutico.

Neste estudo foram analisados os polimorfismos dos genes do biometabolismo *GSTM1*, *GSTT1* e *CYP2D6* em um grupo de 61 pacientes portadores de leucemia mielóide aguda e 67 portadores de leucemia mielóide crônica, pareados por idade, sexo e grupo étnico.

A seleção destes genes deve-se ao fato de terem sido previamente relacionados a uma ampla variedade de cânceres já que seus polimorfismos resultam em proteínas com aumento ou diminuição da atividade metabólica.

Tanto para a LMA quanto para a LMC, os genes *GSTM1* e *CYP2D6* não apresentaram resultados significativos quando analisadas as distribuições de seus genótipos entre pacientes e controles e também em seus resultados de OR (LMA - *GSTM1* $\chi^2_1 = 0,13$; $P > 0,70$, OR = 0,88 – IC 95% = 0,43-1,79; *CYP2D6* - $\chi^2_2 = 5,35$; $P > 0,05$; LMC – *GSTM1* $\chi^2_1 = 2,88$; $P > 0,20$), muito embora deleções no gene *GSTM1*

já tenham sido associadas à leucemia aguda tanto em estudos individuais quanto em meta-análises (YE; SONG, 2005; AYDIN-SAYITOGLU et al., 2006; DONG, 2008; VIJAYAKRISHNAN e HOULSTON, 2010). Por outro lado, TASPINAR et al. em 2008, observou para a LMC que embora a frequência do genótipo nulo *GSTM1* tenha sido mais alta entre os pacientes que entre controles, a diferença não foi estatisticamente significativa (OR = 1,11 - IC 95% = 0,66-186).

Para análise dos genes de fase II do biometabolismo foi utilizada a técnica de PCR-Multiplex, que não permite a identificação dos heterozigotos, mas sim a presença ou ausência do gene. Assumindo que estes genes estejam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, é possível estimar a frequência de heterozigotos, que na LMA foi de 0,45 e 0,43, para o gene *GSTM1* respectivamente, para pacientes e controles e para o gene *GSTT1* foi de 0,29 e 0,43, respectivamente para pacientes e controles. Na LMC as frequências estimadas de heterozigotos para o gene *GSTM1* foram de 0,47 para pacientes e 0,45 para controles, e para o gene *GSTT1* de 0,45 para pacientes e 0,48 para controles. A estimativa de heterozigotos é importante pois permite avaliar a dinâmica gênica na população estudada (TORREZAN, 2006).

Para o gene *CYP2D6* as frequências genotípicas mostraram-se de acordo com o teorema de Hardy-Weinberg tanto para pacientes e controles da amostra de LMA ($\chi^2_1=1,36$; $P>0,20$ e $\chi^2_1= 2,94$; $P>0,05$, respectivamente), quanto para pacientes e controles da amostra de LMC ($\chi^2_1=0,56$; $P>0,30$ e $\chi^2_1=1,80$; $P>0,10$, respectivamente). Embora este gene tenha papel importante na metabolização de drogas e seja um dos mais bem estudados quanto à relação de seus polimorfismos e suscetibilidade, existem ainda poucas informações sobre sua relação com a leucemia mielóide aguda e crônica. No entanto, alguns estudos que analisaram o *CYP2D6* em pacientes com leucemia linfóide aguda (LLA) infantil encontraram associação com um risco aumentado de LLA (SILVEIRA et al., 2010).

Para a LMA, a análise em conjunto dos genes *GSTM1* e *GSTT1* apresentou uma OR significativa (OR= 2,60 com IC 95% = 1,20-5,62), confirmando uma tendência observada em vários estudos que associam os dois genes ao desenvolvimento de câncer. DONG et al., em 2008 afirmaram que dentre todos os estudo de meta análise esses dois genes representam os dados mais consistentes. Os estudos individuais confirmam estas informações (CRUMP et al., 2000; ARRUDA et al., 2001).

Para o gene *GSTT1* foram observados resultados estatisticamente significativos tanto para LMA quanto para LMC na distribuição entre pacientes e controles ($\chi^2_1 = 42,40$; $P < 0,001$ e $\chi^2_1 = 13,06$; $P < 0,001$, respectivamente) e também nas análises do risco relativo (OR = 18,79 - IC 95% = 6,93-50,98 e OR = 4,35 – IC 95% = 1,90-9,95, respectivamente). Estes resultados devem ser interpretados com cautela devido ao tamanho amostral, mas são uma confirmação do estudo realizado anteriormente por Kaviski, 2007, que também encontrou significância estatística deste gene em uma amostra constituída por 45 pacientes e controles para LMC ($\chi^2_1 = 5,40$; $P < 0,05$ e OR=3,61 - IC 95% = 1,17-11,11).

Em concordância com estes dados há os de BAJPAI et al., 2007, que observaram uma diferença estatisticamente significativa entre pacientes portadores de LMC e controles para o genótipo *GSTT1* nulo (OR=2,67 - IC 95%: 1,03-7,01), o mesmo tendo sido descrito por TASPINAR et al., 2008 (OR = 2,82 - IC 95% = 1.58-5.05). Na LMA os nossos dados estão de acordo com os de D'ALÒ et al., 2004, que encontraram um aumento do risco associado com o genótipo *GSTT1* nulo (OR=1,70 – IC 95% = 1,1-2,7) e de BOLUFER et al., 2007 (OR = 2,2 – IC 95% = 1,5-3,2).

7 CONCLUSÕES

Foram encontradas associações positivas entre o genótipo *GSTT1* nulo e o risco do desenvolvimento de leucemia mielóide crônica e leucemia mielóide aguda. Para os outros genes estudados (*GSTM1* e *CYP2D6*) não foi encontrada associação, seja ela positiva ou negativa.

A distribuição das frequências genotípicas dos genes *GSTM1* e *CYP2D6* não diferiram significativamente entre pacientes e controles, tanto para a LMC como para a LMA, entretanto para o gene *GSTT1* foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa para esta distribuição nos dois tipos de leucemia estudados. A associação positiva encontrada entre o genótipo considerado de risco (*GSTT1*0*) confere um risco relativo de 4,34 vezes maior para a LMC e 18,79 vezes maior para a LMA nos indivíduos que apresentam esta deleção, seja ela parcial ou total. Para a leucemia mielóide aguda, foi ainda observado um risco relativo de 2,6 vezes maior em indivíduos que apresentam os dois genes de fase II deletados.

Os outros fatores analisados neste estudo, como os genótipos considerados de risco em conjunto (fase I e II e apenas fase II para LMC e fase I e II para LMA) não apresentaram diferenças significantes quanto à distribuição genotípica entre pacientes e controles, nem associações positivas ou negativas. Estes resultados são tanto corroborados quanto controvertidos pelos trabalhos encontrados na literatura, fato que se deve principalmente às diferenças nas frequências genotípicas entre populações diversas. Para melhor verificação dos resultados encontrados faz-se necessário o aumento do tamanho da amostra de estudo.

Nossos resultados sugerem que o gene *GSTT1* possui um envolvimento significativo com a suscetibilidade tanto à leucemia mielóide crônica quanto com a leucemia mielóide aguda; já os genes *GSTM1* e *CYP2D6*, também envolvidos no biometabolismo de diversos carcinógenos, podem não contribuir de forma isolada para o risco do desenvolvimento da LMC e LMA. No entanto, os mesmos podem ser relevantes numa atuação conjunta com demais genes na gênese de diversos cânceres, inclusive leucemias.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, D. G.; TSIMBERIDOU, A. M. Dasatinib in chronic myeloid leukemia: a review. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, 5, 281–289, 2009.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular Biology of the Cell**. 4th edition. New York: Garland Science, 2002.
- ANWAR, W. A.; ABDEL-RAHMAN, S. Z.; EL-ZEIN, R.; MOSTAFA, H. M.; AU, W. W. Genetic polymorphisms of GSTM1, CYP2E1 and CYP2D6 in Egyptian bladder cancer patients. **Carcinogenesis**, 17, 1923-1929, 1996.
- ARRUDA, V. R.; LIMA, C. S.; GRIGNOLI, C. R.; et al. Increased risk for acute myeloid leukaemia in individuals with glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and theta 1 (GSTT1) gene defects. **Eur J Haematol.**, 66, 383-388, 2001.
- AUTRUP, H. Genetic polymorphisms in human xenobiotic metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. **Mutat. Res.**, 464, 65-76, 2000.
- AYDIN-SAYITOGLU, M.; HATIRNAZ, O.; ERENSOY, N.; OZBEK, U. Role of CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1, GSTT1, and GSTM1 genes in the susceptibility to acute leukemias. **Am J Hematol.**, 81, 162-70, 2006.
- BABA, A. I.; CÂTOI, C. **Comparative Oncology**. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy; 2007.
- BAJPAI, P.; TRIPATHI, A. K.; AGRAWAL, D. Increased frequencies of Gutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) null genotypes in Indian Patients with Chronic myeloid leukaemia. **Leukaemia Research**, 2007.
- BAYRAKTAR, S.; GOODMAN, M. Detection of BCR-ABL Positive Cells in an Asymptomatic Patient: A Case Report and Literature Review. **Case Reports in Medicine**, 1-3, 2010.
- BEIGUELMAN, B. **Curso Prático de Bioestatística**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1988.
- BERNARD, S.; NEVILLE, K. A.; NGYUEN, A. N.; FLOCKHART, D. A. Interethnic Differences in Genetic Polymorphisms of CYP2D6 in the U.S. Population: Clinical Implications. **The Oncologist**. 11, 126-135, 2006.
- BIGNON, J. D.; FERNANDEZ-VIÑA, M. A. Protocols of the 12th Internacional Histocompatibility Workshop for Typing of HLA class II alleles by DNA amplification by the polimerase chain reaction (PCR) and hybridization with sequence specific oligonucleotide probes (SSOP). In CHARRON, D. **HLA – Genetic diversity of HLA: funcional and medical implication**. Paris: EDK, 1997.
- BOARD, P.; COGGAN, M.; JOHNSTON, P.; ROSS, V.; SUZUKI, T.; WEBB, G. Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. **Pharm. Therap.** 48, 357-369, 1990.
- BOLUFER, P.; COLLADO, M.; BARRAGÁN, E.; CERVERA, J.; CALASANZ, M. J.; COLOMER, D.; ROMAN-GÓMEZ, J.; SANZ, M. A. The potential effect of gender in combination with common genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes on the risk of developing acute leukemia. **Haematologica**, 92, 308-314, 2007.
- CARACO, Y. Genes and the Response to Drugs. **The New England Journal of Medicine**, 351, 2867-2869, 2004.

- CHEFSON, A.; AUCLAIR, K. Progress towards the easier use of P450 enzymes. **Mol Biosyst.**, 2, 462-9, 2006.
- CHOPRA, R.; PU, Q. Q.; ELEFANTY, A. G. Biology of BCR-ABL. **Blood Reviews**, 13, 211-229, 1999.
- COOPER, G. M. Elements of human cancer. **Bost., Jon. and Bar. Publishers**, 1994.
- CRUMP, C.; CHEN, C.; APPELBAUM, F. R.; et al. Glutathione S-transferase theta 1 gene deletion and risk of acute myeloid leukemia. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, 9, 457-460, 2000.
- LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: A review. **Mutat. Res.**, 463, 247-283, 2000.
- D'ALÒ, F.; VOSO, M. T.; GUIDI, F.; MASSINI, G.; SCARDOCCI, A.; SICA, S.; PAGANO, L.; HOHAUS, S.; LEONE, G. Polymorphisms of CYP1A1 and glutathione S-transferase and susceptibility to adult acute myeloid leukemia. **Haematologica**, 89, 664-670, 2004.
- DEININGER, M. W. Milestones and monitoring in patients with CML treated with imatinib. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, 419-26, 2008.
- DESCHLER, B.; LÜBBERT, M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. **Cancer**, 107, 2099-107, 2006.
- DONG, L. M.; POTTER, J.D.; WHITE, E.; ULRICH, C. M.; CARDON, L. R.; PETERS, U. Genetic susceptibility to cancer: the role of polymorphisms in candidate genes. **JAMA**, 20, 2423-243, 2008.
- EVANS, W. E.; RELLING, M. V. Moving towards individualized medicine with pharmacogenomics. **Nature**, 429, 464-468, 2004.
- FRANK, S. A. **Dynamics of Cancer. Incidence, Inheritance, and Evolution**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 2007.
- GOUGH, A. C.; SMITH, C. A. D.; HOWEL, S. M.; WOLF, C. R.; BRYANT, S. P.; SPURR, N. K. Localization of the CYP2D gene locus to human chromosome 22q13.1 by polymerase chain reaction, in situ hybridization, and linkage analysis. **Genomics**, 15, 430-432, 1993.
- GREGORY, T. K.; WALD, D.; CHEN, Y.; VERMAAT, J. M.; XIONG, Y.; TSE, W. J. Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. **Hematol Oncol**, 2, 2-23, 2009.
- GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, R. C. **Modern Genetic Analysis**, New York: W. H. Freeman & Co., 1999.
- WEINBERG, R. A. Tumor supressor genes. **Science**, 254, 1138-1145, 1991.
- GRIMWADE, D.; HILLS, R., K. Independent prognostic factors for AML outcome. **American Society of Hematology**, 385-395, 2009.
- HATAGIMA, A. Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 18, 357-377, 2002.
- HARDY P. A.; ZACHARIAS H. Reappraisal of the Hansemann-Boveri hypothesis on the origin of tumors. **Cell biology international**, 12, 983-92, 2005.
- HEIM, S.; MITELMAN, F. **Cancer Cytogenetics: Chromosomal and molecular aberrations of tumor cells**. Second edition. Wiley-Liss, Inc. 1995.
- INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>> Acesso em: Fevereiro de 2010.

- INGELMAN-SUNDBERG, M.; EVANS, W. E. Unravelling the functional genomics of the human CYP2D6 gene locus. **Pharmacogenetics**, 11, 553-554, 2001.
- INGELMAN-SUNDBERG, M.; OSCARSON, M.; MCLELLAN, R. A. Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment. **Trends Pharmacol Sci.**, 20, 342-349, 1999.
- KAVISKI, R. **Análise dos Genes do Biometabolismo GSTT1, GSTM1 e CYP2D6 em Pacientes com Leucemia Mielóide Aguda**, UFPR, 2007.
- KUFE, D. W.; POLLOCK, R. E.; WEICHSELBAUM, R. R.; BAST, R. C., JR.; GANSLER, T. S.; HOLLAND, J. F.; FREI III, E. **Holland-Frei Cancer Medicine**. Hamilton: BC Decker Inc. 2003
- LOURENÇO, G. J.; ORTEGA, M. M.; NASCIMENTO, H.; TEORI, M. T.; DE SOUZA, C. A. ; COSTA, F. F.; LIMA, C. S. P. Polymorphisms of glutathione S-transferase mu 1 (*GSTM1*) and theta 1 (*GSTT1*) genes in chronic myeloid leukaemia, **Eur. Journal of Haematology**, 75, 530-531, 2005.
- LÖWENBERG, B. Acute myeloid leukemia: the challenge of capturing disease variety. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, 1-11, 2008.
- LUSIS, M. K. P. Classificação FAB das leucemias mielóides agudas. **Rev. bras. hematol. Hemoter.**, 22, 175-178, 2000.
- MA, M. K.; WOO, M. H.; McLEOD, H. L. Genetic basis of drug metabolism. **Am. Journal Health Syst. Pharm.**, 59, 2061-2069, 2002.
- MARU, Y.; WITTE, O. N. The BCR gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. **Cell**, 67, 459-468, 1991.
- MIITELMAN, F. Chromosomes, genes and Cancer. **CA Cancer J Clin.**, 44, 133-135, 1994.
- NEBERT, D.W.; ADESNIK, M.; COON, M.J., ESTABROOK, R.W.; GONZALEZ, F.J.; GUENGERICH, F.P.; GUNSALUS, I.C.; JOHNSON, E.F.; KEMPER, B.; LEVIN, W.; PHILLIPS, I.R.; SATO, R.; WATERMAN, M.R. The P450 superfamily: recommended nomenclature. **DNA**, 6, 1-11, 1987.
- NOWELL, P. C.; Progress with Chronic Myelogenous Leukemia: A Personal Perspective over Four Decades. **Annu. Ver. Medicine**, 53, 1-13, 2002.
- NOWELL, P. C.; HUNGERFORD, D. A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. **Science**, 132, 1497, 1960.
- PARL, F. F. Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. **Cancer Lett.**, 221, 123-129, 2005.
- PEMBLE, S.; SCHROEDER, K. R.; SPENCER, S. R.; MEYER, D. J.; HALLIER, E.; BOLT, H. M.; KETTERER, B.; TAYLOR, J. B. Human glutathione S-transferase theta (*GSTT1*): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. **Bioch. J.**, 300, 271-276, 1994.
- PERSSON I, JOHANSSON I, BERGLING H, DAHL ML, SEIDEGARD J, RYLANDER R, RANNUG A, HOGBERG J, SUNDBERG MI. Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. **FEBS Lett.** 319(3), 207-211, 1993.
- PICKETT, C.B.; LU, A.Y.H. Glutathione S-transferases: gene structure, regulation, and biological function. **Ann. Rev. Bioch.**, 58, 743-764, 1989.
- REKSODIPUTRO, A. H.; SYAFEI, S.; PRAYOGO, N.; KARSONO, B.; RINALDI, I.; RAJABTO, W.; MULANSARI, N. A. Clinical Characteristics and Hematologic Responses to Imatinib in Patients with Chronic Phase Myeloid Leukemia (CML) at Cipto Mangunkusumo Hospital. **Acta Med Indones**, 42, 2-5, 2010.

- RADICH, J. P. The Biology of CML blast crisis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 384-91, 2007.
- ROCHA, J. C. C.; FERREIRA, C. G. **Oncologia Molecular**, RJ: Atheneu, 2006.
- RODDAM, P. L.; ALLAN, J. M.; ROLLINSON, S.; SMITH, A. G.; WILLET, E. V.; SWIRSKY, D.; ROMAN, E.; MORGAN, G. J. Poor metabolizer status at the cutochrome P450 2C9 and 2D6 loci does not modulate susceptibility to therapy-related acute myeloid leukaemia. **Br Journal Haematology**, 121, 192-194, 2003.
- SACHSE, C.; BROCKMOLLER, J.; BAUER, S.; ROOTS, I. Cytocrome P450 2D6 variants in a Caucasian population: allele frequencies and phenotypic consequences. **Am, Journal H. Genetic**, 60, 265-271, 1997.
- SILVA, J. da.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- STUVEN, T.; GRIESE, E. U.; KROEMER, H. K.; EICHELBAUM, M.; ZANGER, U. M. Rapid detection of CYP2D6 null alleles by long distance-and multiplex-polymerase chain reaction. **Pharmacogenetics**, 6, 417-421, 1996.
- SILVEIRA, V. da S.; CANALLE, R.; SCRIDEI, C. A.; QUEIROZ, R. G.; TONE, L. G. Role of the CYP2D6, EPHX1, MPO, and NQO1 genes in the susceptibility to acute lymphoblastic leukemia in Brazilian children. **Environ Mol Mutagen.**, 51, 48-56, 2010.
- SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutat. Res.**, 402, 7-14, 1998.
- TASPINAR, M.; AYDOS, S. E.; COMEZ, O.; ELHAN, A. H.; KARABULUT, H. G.; SUNGUROGLU, A. CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukemia. **Swiss Med Wkly**, 138, 12-17, 2008.
- TORREZAN, G. T. **Estudo dos Polimorfismos dos genes GSTM1, GSTT1, CYP2E1 e CYP17 em Cânceres Mamários Esporádicos**, UFPR, 2006.
- VAN POPPEL, G.; DE VOGEL, N.; VAN BLADEREN, P. J.; KOK, F. J. Increased cytogenetic damage in smokers deficient in glutathione S-transferase isozyme mu. **Carcinogenesis**, 13, 303-305, 1992.
- VIJAYAKRISHNAN, J.; HOULSTON, R. Candidate gene association studies and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia: a systematic review and meta-analysis. **Haematologica**, 2010.
- VON BUBNOFF N.; DUYSER J. Chronic myelogenous leukemia: treatment and monitoring. **Dtsch Arztebl Int.**, 107, 114-21, 2010.
- WANG, A.H.; WANG, Y.Y.; YAO, Y.; XU Z.Z.; ZHOU, L.; WANG, L.; ZHANG, L.; CHEN, Y.; SHEN, Z. X.; HU, J.; LI, J. M. Summary of 615 patients of chronic myeloid leukemia in Shanghai from 2001 to 2006. **J Exp Clin Cancer Res**, 3, 29-20, 2010.
- WEINBERG, R. A. Tumor supressor genes. **Science**, 254, 1138-1145, 1991.
- WÜNSCH, V. F.; GATTÁS, G. J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública. **Cad. Saúde Pública**, 17, 467-480, 2001.
- YE, Z.; SONG, H. Glutathione s-transferase polymorphisms (GSTM1, GSTP1 and GSTT1) and the risk of acute leukaemia: a systematic review and meta-analysis. **Eur J Cancer**, 41, 980-989, 2005.

APÊNDICES

APÊNDICE A: DADOS BRUTOS OBTIDOS PARA LMA E LMC

Leucemia Mielóide Aguda – Sexo Feminino

Paciente	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1	Controle	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1
1	61	C	F		-	-	1	62	C	F	+/-	-	+
2	63	C	F	+/+	+	-	2	59	C	F	+/-	+	+
3	60	C	F		+	-	3	55	C	F	+/-	-	+
4	64	C	F	+/-	+	-	4	59	C	F	+/-	+	+
5	50	C	F	+/+	-	-	5	45	C	F	+/-	-	+
6	48	C	F	+/+	+	-	6	43	C	F	+/-	-	+
7	37	C	F	+/+	+	+	7	40	C	F	+/+	+	+
8	42	C	F	+/+	+	+	8	43	C	F	+/+	-	+
9	42	C	F		-	-	9	43	C	F	+/+	+	+
10	44	C	F		-	-	10	44	C	F	+/+	+	+
11	27	N	F	+/+	-	-	11	22	N	F	+/+	+	+
12	27	C	F	+/-	+	+	12	22	C	F	+/+	+	+
13	51	C	F	+/+	+	-	13	46	C	F	+/-	-	+
14	56	C	F		+	-	14	52	C	F	+/+	-	+
15	49	C	F		+	-	15	44	C	F	+/-	+	+
16	56	C	F	+/+	-	-	16	52	C	F	+/+	+	-
17	25	C	F		-	-	17	21	C	F	+/+	-	-
18	43	C	F	+/-	-	-	18	41	C	F	+/+	+	+
19	62	C	F	+/+	-	-	19	54	C	F	+/+	+	+
20	68	C	F	+/+	+	-	20	62	C	F	+/-	-	+
21	31	C	F	+/-	+	-	21	31	C	F	+/+	-	+
22	29	N	F		+	-	22	24	N	F	+/+	+	+
23	32	N	F	+/+	+	-	23	29	N	F	+/+	+	+
24	50	C	F		-	-	24	48	C	F	+/-	+	+
25	35	C	F	+/-	+	-	25	40	C	F	+/+	+	-
26	47	C	F	+/-	-	+	26	42	C	F	+/+	+	-
27	51	C	F	+/+	+	+	27	46	C	F	+/-	-	+
28	28	C	F	+/-	+	+	28	23	C	F	+/-	-	+

Leucemia Mielóide Aguda – Sexo Masculino

Paciente	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1	Controle	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1
29	30	C	M	+/-	-	-	29	27	C	M	+/-	+	+
30	40	C	M		-	-	30	41	C	M	+/+	-	+
31	42	C	M	+/+	+	-	31	42	C	M	+/-	+	+
32	44	C	M	+/+	+	-	32	43	C	M	+/-	+	+
33	20	C	M	-/-	+	+	33	20	C	M	+/+	+	+
34	21	N	M	+/+	-	-	34	23	N	M	+/+	+	+
35	35	C	M		+	-	35	40	C	M	+/-	-	+
36	27	C	M	+/+	-	-	36	23	C	M	+/+	+	+
37	37	C	M	+/+	-	-	37	41	C	M	+/+	+	+
38	48	C	M		+	+	38	53	C	M	+/+	-	+
39	46	C	M	+/+	+	+	39	51	C	M	+/+	+	+
40	52	C	M	+/+	-	-	40	48	C	M	+/+	-	-
41	41	C	M	+/+	-	-	41	41	C	M	+/+	-	+
42	40	C	M	+/+	+	+	42	41	C	M	+/+	+	+
43	29	C	M	+/+	-	-	43	24	C	M	+/+	-	+
44	17	C	M		-	+	44	18	C	M	+/+	-	+
45	48	C	M		+	-	45	51	C	M	+/-	-	+
46	37	C	M	+/+	-	+	46	42	C	M	+/+	-	+
47	41	C	M	+/+	+	+	47	43	C	M	+/-	-	+
48	53	C	M	+/-	-	-	48	58	C	M	+/-	-	+
49	46	C	M	+/+	+	+	49	51	C	M	+/+	+	-
50	52	C	M	+/+	+	+	50	52	C	M	+/+	+	+
51	46	C	M	+/+	-	-	51	51	C	M	+/+	-	+
52	20	C	M	-/-	-	+	52	24	C	M	+/+	-	+
53	17	C	M	+/+	+	-	53	21	C	M	+/+	+	+
54	36	C	M	+/+	+	-	54	40	C	M	+/-	-	+
55	27	C	M	+/+	+	-	55	28	C	M	+/-	-	+
56	37	C	M		-	-	56	40	C	M	+/+	+	+
57	14	N	M	+/+	+	+	57	18	N	M	+/+	-	+
58	40	C	M	+/+	-	-	58	40	C	M	+/+	-	+
59	35	C	M	+/+	-	+	59	40	C	M	+/-	+	+
60	17	N	M	+/-	+	+	60	21	N	M	+/+	+	+
61	30	N	M	+/+	+	+	61	27	N	M	+/-	+	+

Leucemia Mielóide Crônica – Sexo Feminino

Paciente	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1	Controle	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1
1	47	C	F	+/+	+	+	1	43	C	F	+/-	-	-
2	57	C	F	+/+	-	+	2	50	C	F	+/+	-	+
3	26	C	F	+/+	-	+	3	25	C	F	+/+	+	-
4	59	C	F	+/+	+	-	4	54	C	F	+/+	+	+
5	50	C	F	+/+	-	-	5	45	C	F	+/+	+	+
6	32	C	F	+/-	+	+	6	40	C	F	+/-	+	+
7	65	C	F	+/-	+	-	7	59	C	F	+/-	+	+
8	45	C	F	+/+	+	-	8	40	C	F	+/+	+	+
9	30	C	F	+/+	+	-	9	31	C	F	+/+	-	+
10	40	N	F	+/-	+	+	10	40	N	F	+/+	+	+
11	59	C	F	+/+	+	+	11	53	C	F	+/-	+	+
12	63	C	F	+/-	-	-	12	55	C	F	+/-	-	+
13	59	C	F	+/+	-	-	13	52	C	F	+/+	-	+
14	66	C	F	+/+	+	+	14	62	C	F	+/-	-	+
15	42	C	F	+/+	+	+	15	42	C	F	+/+	+	+
16	57	C	F	+/+	+	+	16	52	C	F	-/-	+	+
17	32	N	F	+/+	+	+	17	31	N	F	+/+	+	+
18	49	C	F	-/-	+	-	18	46	C	F	+/+	+	-
19	46	C	F	+/+	-	+	19	42	C	F	+/+	+	+
20	61	C	F	+/-	+	+	20	52	C	F	+/+	+	-
21	43	C	F	+/-	+	+	21	40	C	F	+/+	+	+
22	26	C	F	+/+	+	+	22	24	C	F	+/-	+	-
23	60	C	F	+/+	-	+	23	55	C	F	+/-	-	+
24	58	C	F	+/-	-	-	24	53	C	F	+/-	+	+
25	43	C	F	+/+	+	-	25	44	C	F	+/-	+	-
26	44	C	F	+/+	+	+	26	40	C	F	+/-	+	+
27	44	C	F	+/+	+	-	27	41	C	F	+/+	-	+
28	37	C	F		+	-	28	41	C	F	+/-	-	+
29	35	C	F	+/+	+	-	29	40	C	F	+/-	+	+
30	63	C	F	+/-	+	-	30	54	C	F	+/+	+	+
31	56	C	F	+/+	-	-	31	49	C	F	+/+	+	+
32	48	C	F		+	-	32	43	C	F		-	+
33	52	C	F	+/-	-	-	33	45	C	F	+/+	-	-
34	46	C	F	+/+	-	+	34	41	C	F	+/+	+	+
35	49	C	F	+/+	+	-	35	44	C	F	+/+	-	+

Leucemia Mielóide Crônica – Sexo Masculino

Paciente	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1	Controle	Idade	Etnia	Sexo	CYP 2D6	GSTM1	GSTT1
36	54	C	M	+/+	-	-	36	48	C	M	+/-	+	+
37	41	C	M	+/-	-	+	37	40	C	M	+/+	-	+
38	61	C	M	+/+	+	+	38	58	C	M	+/-	-	+
39	38	N	M	+/+	+	+	39	34	N	M	+/+	+	+
40	17	N	M	+/+	+	+	40	22	N	M	+/+	+	+
41	45	C	M	+/-	-	+	41	40	C	M	+/-	-	+
42	32	C	M	+/+	+	-	42	40	C	M	+/+	+	+
43	59	C	M	+/+	-	+	43	53	C	M	+/+	-	+
44	31	C	M	+/-	+	-	44	28	C	M	+/-	+	+
45	60	C	M	+/+	+	+	45	53	C	M	+/+	-	+
46	44	C	M	+/+	-	+	46	40	C	M	+/+	+	+
47	59	C	M	+/+	-	-	47	52	C	M	+/+	+	+
48	47	C	M	+/-	-	+	48	42	C	M	+/-	-	+
49	29	C	M	+/-	+	-	49	23	C	M	+/+	+	+
50	65	C	M	+/-	+	+	50	58	C	M	+/-	-	+
51	45	C	M	+/+	+	+	51	42	C	M	+/+	+	+
52	39	C	M	+/+	-	+	52	43	C	M	-/-	+	+
53	52	C	M	+/+	-	-	53	47	C	M	+/+	-	+
54	67	C	M	+/-	+	+	54	58	C	M	+/-	-	+
55	54	C	M	+/+	-	-	55	51	C	M	+/-	-	+
56	54	C	M	+/+	+	+	56	48	C	M	+/+	+	+
57	55	C	M	+/+	+	+	57	51	C	M	+/+	-	+
58	27	N	M		-	-	58	22	N	M	+/-	+	+
59	50	N	M	+/+	+	+	59	45	N	M	+/-	+	+
60	56	C	M	+/-	-	+	60	51	C	M	+/+	+	-
61	35	N	M	+/+	+	-	61	30	N	M	+/+	-	-
62	61	C	M	+/-	-	-	62	58	C	M	+/-	-	+
63	65	C	M	+/+	+	+	63	58	C	M	+/-	-	+
64	40	N	M	+/+	-	+	64	36	N	M	+/+	-	+
65	64	C	M	+/+	+	+	65	58	C	M	+/-	-	+
66	42	C	M	+/+	-	-	66	43	C	M	+/+	-	-
67	53	C	M	+/+	-	+	67	48	C	M	+/-	+	+